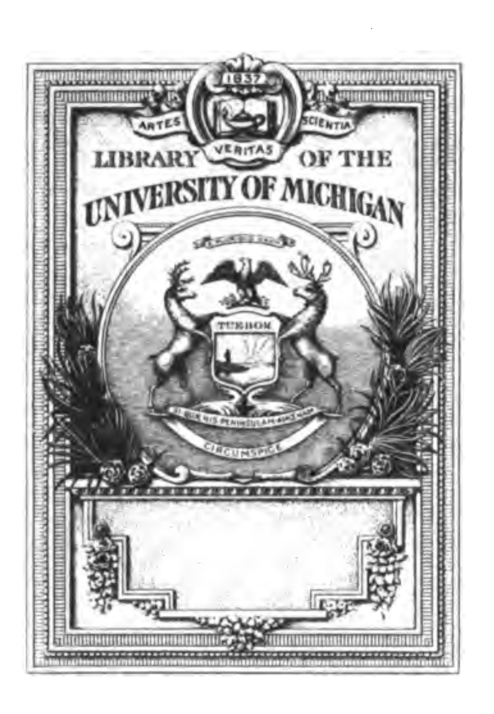





1837
ARTES
SCIENTIA
VERITAS
LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF MICHIGAN
TUEBOR
CIRCUMSPICE



Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

herausgegeben von

Prof. Dr. Emil Abderhalden.

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

Unter Mitarbeit von zahlreichen Fachmännern

herausgegeben von

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. med. et phil. h. c. **Emil Abderhalden**
Direktor des Physiologischen Institutes der Universität Halle a. d. S.

Abteilung I:
Chemische Methoden
Teil 8

Urban & Schwarzenberg

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 b

Wien I
Mahlerstraße 4

1922

Spezielle analytische und synthetische Methoden

Eiweißstoffe

Proteide und Proteine

Bearbeitet von

Prof. Dr. **Hans Jessen-Hansen**-Kopenhagen.
Prof. Dr. **William Küster**-Stuttgart.
Prof. Dr. **Thomas B. Osborne**-New Haven.
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. **Julius Pohl**-Breslau.
Prof. Dr. **Peter Rona**-Berlin.
Priv.-Doz. Dr. **Franz Samuely** (†)-Freiburg i. Br.
Prof. Dr. **Fr. N. Schulz**-Jena.
Prof. Dr. **Otto Schumm**-Hamburg.
Prof. Dr. **Hermann Steudel**-Berlin-Charlottenburg.
Dr. phil. **Eduard Strauss**-Frankfurt a. M.
Priv.-Doz. Dr. **Siegfried Thannhauser**-München.
Prof. Dr. **E. Winterstein**-Zürich.

Mit 35 Abbildungen

Urban & Schwarzenberg

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 b

Wien I
Mahlerstraße 4

1922

Druck R. Spies & Co. Wien

Vorwort.

Auf allen Gebieten der Forschung hat die Spezialisierung die höchsten Triumphe gefeiert. Die Verwendung einer ganzen Forscherkraft auf ein bestimmtes Problem hat zu immer feineren und immer einwandfreieren Methoden geführt und damit immer schärfere und eindeutigere Fragestellungen ermöglicht. So schoß denn da und dort ein Gipfel der wissenschaftlichen Forschung nach dem anderen in die Höhe. Sie blieben zunächst isoliert. Doch nicht lange dauerte es, bis weit über die Einzelforschungen hinaus Beziehungen zu anderen Forschungsgebieten gefunden waren. Ganz von selbst gliedern sich scheinbar vollständig eigenartige, für sich bestehende Gebiete an bereits vorhandene an. In buntem Wechselspiel wird bald da, bald dort die Fahne der Wissenschaft nach dieser oder jener Richtung weit vorangetragen. Schließlich finden sich immer wieder Anschlüsse. Nie war das Bestreben größer als jetzt, von Gebiet zu Gebiet Brücken zu schlagen und alles in eine Einheit zusammenzufassen, was man unter Biologie im weitesten Sinne des Wortes umfassen kann. Die Pioniere für diese Umfassung scheinbar heterogener Forschungsgebiete sind die Methoden und die geistige Arbeit, die mit kühnem Fluge durch Theorien und Hypothesen Tatsachen zu ordnen und in Wechselbeziehung zu bringen sucht.

Jeder Forscher hat das Bedürfnis, dieser oder jener Fragestellung über den mehr oder weniger engen Rahmen seines Forschungsgebietes hinaus nachzugehen. Bald zeigen sich Schwierigkeiten. Ungewohnte Methoden sind notwendig, um die Brücke zu anderen Gebieten zu schlagen. An Stelle einer bestimmten Methode trifft man auf mehrere. Welche ist nun die einwandfreieste? Bevor diese Frage entschieden ist, läßt mancher Forscher aus Mangel an Zeit den Vorsatz fallen, eine bestimmte Arbeit durchzuführen.

Hier möchte das groß angelegte Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden helfend eingreifen. In ihm soll nicht nach Vollständigkeit gestrebt werden. Das Handbuch verfolgt vielmehr ausschließlich praktische Zwecke. Es sollen nur diejenigen Methoden zur Darstellung gelangen, die sich voll bewährt haben. Alle anderen und solche, die überholt sind, sind nicht erwähnt. Das Handbuch soll ein rechtes Arbeitsbuch sein. Nach den Schilderungen der Methoden soll direkt gearbeitet werden können. Zahlreiche Abbildungen erleichtern das Verständnis.

Das Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden wird ein Dokument des Standes der gesamten biologischen Wissenschaften darstellen, wie es kein zweites gibt. Die Art der Methoden auf jedem einzelnen Gebiete spricht beredter für den Stand der Forschung als jede noch so glänzende Darstellung der Ergebnisse.

Möge das Handbuch seinen Zweck erfüllen, recht vielen Forschern ein zuverlässiger und nie versagender Führer zu sein. Möge es darüber hinaus Anregung geben und befruchtend wirken. Damit das Handbuch seinen vollen Wert behält, ist es notwendig, daß die Forscher der ganzen Welt mitarbeiten, auf Lücken und Fehler aufmerksam machen und selbst dazu beitragen, daß neue Methoden weitesten Kreisen in kürzester Zeit bekannt werden.

Halle a. d. S., Neujahr 1921.

Emil Abderhalden.

INHALTSVERZEICHNIS.

Zusammengesetzte Eiweißstoffe, Proteide und ihre Bausteine.

Nukleoproteide,

nach der Bearbeitung von *Franz Samuely*, Freiburg, neubearbeitet von *Prof. H. Steudel*, Berlin.

Darstellung und Nachweis der Nukleinsäuren,

bearbeitet von *Prof. H. Steudel*, Berlin.

Vollständiger Abbau der Nukleinsäure, Nachw is der Bausteine, deren Darstellung,

bearbeitet von *Prof. H. Steudel*, Berlin.



Abbau der Nukleinsäuren. Teilweiser Abbau und Isolierung der Spaltstücke.

bearbeitet von Privatdozent *Dr. Thannhauser*, München.



Isolierung von Purinbasen und Alloxurkörpern aus Pflanzen,

bearbeitet von *Prof. Dr. E. Winterstein*, Zürich.

Synthetische Versuche auf dem Gebiete der Nukleinsäuren,

bearbeitet von Privatdozent *Dr. Thannhauser*, München.



Synthese von Nukleosiden und einfachen Nukleotiden,

bearbeitet von Privatdozent *Dr. Thannhauser*, München.

Seite

Darstellung von Blutfarbstoffen,

bearbeitet von *Prof. Dr. Fr. N. Schulz*, Jena.



Die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes, ihr Nachweis und ihre Derivate,

bearbeitet von *Prof. Dr. William Küster*, Stuttgart.

Studien auf dem Gebiete der Porphyrine,

bearbeitet von *Prof. Dr. William Küster*, Stuttgart.

Der Abbau des Hämatins und der Porphyrine und die Synthese der Spaltungsprodukte,

bearbeitet von *Prof. Dr. William Küster*, Stuttgart.

Synthesen mehrkerniger Pyrrolderivate und die Konstitution des Hämins,

bearbeitet von *Prof. Dr. William Küster*, Stuttgart.

Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte des Bilirubins,

bearbeitet von *Prof. Dr. William Küster*, Stuttgart.



Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum. Nachweis und Bestimmung von Porphyrin in Leber, Niere und anderen Organen. Nachweis von Porphyrin in Knochen,

bearbeitet von Prof. *Dr. O. Schumm*, Hamburg.

Bildung, Vorkommen und Merkmale des Hämatins, Nachweis und Bestimmung von Hämatin im Blutserum,

Einfache Eiweißstoffe, Proteine.

Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt,

bearbeitet von *Prof. Dr. Thomas B. Osborne*, New Haven, Connecticut, U. S. A. und *Dr. phil. E. Strauss*, Frankfurt a. M.

II. Darstellung der Proteine der Tierwelt.

Darstellung von kristallisiertem Eiweiß,

bearbeitet von *Prof. Dr. Fr. N. Schulz*, Jena.

Eigentliche Proteine,

bearbeitet von *Dr. med. Franz Samuely* † und *Dr. phil. Eduard Strauss*, Frankfurt a. M

Seite



Seite

Proteinoide,

bearbeitet von *Dr. phil. Eduard Strauss*, Frankfurt a. M.

Histone und Protamine,

bearbeitet von *Prof. Dr. H. Steudel*, Berlin.

Das Arbeiten mit Organeiweiß,

bearbeitet von *Prof. Dr. J. Pohl*, Breslau.



Darstellung und Untersuchung eines wohldefinierten Eiweißstoffes,

bearbeitet von *Dr. Hans Jessen-Hansen*, Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.



Tierische Pigmente und Farbstoffe,

von *Franz Samuely* †, bearbeitet von *Eduard Strauss*, Frankfurt a. M.

Berichtigungen.

S. 157. In der Bezeichnung der letzten Formel unten muß es heißen: „1·7-Dimethyl-6-oxy-2-chlorpurin“ statt „. . . -6-oxyl- . . .“

S. 220. In der Überschrift „*B.* Darstellung von Mäsohämin“ muß es heißen „Mesohämin“.

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

Unter Mitarbeit von über 400 bedeutenden Fachmännern herausgegeben von
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Emil Abderhalden
Direktor des Physiologischen Institutes der Universität Halle a. d. Saale

Abt. I, Chemische Methoden, Teil 8, Heft 1

Zusammengesetzte Eiweißkörper. Proteide
(Nukleoproteide und ihre Spaltprodukte)

Hermann Steudel-Berlin, V. Thannhauser-München
und E. Winterstein-Zürich

Nukleoproteide, Nukleinsäuren und ihre Abbaustufen

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 B

Urban & Schwarzenberg
1920

Wien I
Maximilianstraße 4

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Bisher liegen vor:

Einführung von **Emil Abderhalden.** Nebst einer vollständigen und ausführlichen Inhaltsübersicht der 13 Abteilungen des Werkes . . . . M 2.–

Lfg. 1 (Abt. I, Teil 9): **Schmidt** und **Grafe,** Alkaloide . . . . M 60.–

Lfg. 2 (Abt. III, A.): **v. Sanden,** Praktische Mathematik. Mit 21 Textabbildungen. — **Eichwald,** Mathematische Behandlung der chemischen Kinetik . . . . M 15.–

Lfg. 3 (Abt. V, Teil 6): **Koeppe,** Die biophysikalischen Untersuchungsmethoden der normalen und pathologischen Histologie des lebenden Auges . . . . M 20.–

Lfg. 4 (Abt. VI, A.): **Wirth,** Spezielle psychophysische Maßmethoden . . . . M 36.–

Lfg. 5 (Abt. XIII, Teil 1): **Schürmann,** Methoden der Immunisierung. Antisera. Technik der Gewinnung, Auswertung und Anwendung . . . . M 20.–

Lfg. 6 (Abt. I, Teil 1): **Krämer** und **Schrader,** Darstellung der wichtigsten anorganischen und organischen Reagentien . . . . M 17.–

Lfg. 7 (Abt. III, B.): **Bachmann,** Methoden zur Erforschung der feineren Struktur von Gelen und Gallerten. — **Liesegang,** Spezielle Methoden der Diffusion in Gallerten . . . M 15 –

Lfg. 8 (Abt. VI, A.): **Kirschmann,** Grundzüge der psychologischen Maßmethoden . . M 14.–

Lfg. 9 (Abt. I, Teil 4): **Spinner,** Kohlenwasserstoffe. Allgem. Methoden zu ihrem Nachweis. Die wichtigsten Methoden ihrer Darstellung. Qualitativer und quantitativer Nachweis der einzelnen biologisch wichtigen Kohlenwasserstoffe. Ihre Isolierung . . . . M 7.–

Lfg. 10 (Abt. IV, Teil 10): **Müller,** Methodik der biologischen Gasanalyse. — **Krogh,** Mikrogasanalyse. — **Straub,** Technik der Blutgasanalyse nach Barcroft. — **Müller,** Quantitative Bestimmung des Gasstoffwechsels mittels des Zuntz-Geppertschen Apparates . M 36.–

Lfg. 11 (Abt. I, Teil 4): **Eichwald** und **Weil,** Alkohole, Ketone, Aldehyde, Oxyketone, Oxyaldehyde, Phenol- und Methoxylgruppe . . . . M 42.–

Lfg. 12 (Abt. V, Teil 7): **Budde,** Mathematische Theorie der Gehörsempfindung . . . M 30.–

Lfg. 13 (Abt. XI, Teil 2): **Grafe,** Die physikalisch-chemische Analyse der Pflanzenzelle. Methodik der Permeabilitätsbestimmung bei Pflanzenzellen. Anwendung von Adsorption und Kapillarität zur biochemischen Analyse. Messung der Gas- und Wasserbewegungsvorgänge im Pflanzenorganismus . . . . M 27.–

Lfg. 14 (Abt. I, Teil 8): **Steudel, Thannhauser** und **Winterstein,** Nukleoproteide, Nukleinsäuren und ihre Abbaustufen . . . . M 27.–

Demnächst erscheinen:

Lieferung aus Abt. I, Teil 10: **Fonrobert, Harries, Grafe** und **Brieger,** Kautschuk und Flechtenstoffe.

Lieferung aus Abt. V, Teil 3: **Spemann,** Mikrochirurgische Operationstechnik. — **Barfurth,** Erforschung der Regeneration bei Tieren. — **Przibram,** Studium des Einflusses der Wärme, des Lichtes, der Elektrizität, der Schwerkraft und Zentrifugalkraft auf die Entwicklung. — **Herbst,** Die chemischen und physikalischen Methoden auf dem Gebiete der Entwicklungsmechanik. — **Neumayer,** Technik der experimentellen Embryologie.

Lieferung aus Abt. I, Teil 3: **Biehringer,** Die wichtigsten stöchiometrischen Berechnungen. — **Emich,** Methoden der Mikrochemie.

Lieferung aus Abt. I, Teil 3: **Lieb,** Die Mikroelementaranalyse mit Einschluß der Halogenbestimmung nach Fritz Pregl. — **Dubsky,** Halb-Mikroelementaranalyse nach J. V. Dubsky. — **Fodor,** Die Mikro- und Makrokjeldahl-Stickstoffbestimmung. — **Simonis,** Makroelementaranalyse mit Einschluß der Halogenbestimmung. — **Dennstedt,** Die vereinfachte Elementaranalyse. — **Oelsner,** Methodik der Gesamtstickstoffbestimmung in Gegenwart von Nitrat und Nitrit.

Lieferung aus Abt. I, Teil 3: **Herzig,** Makrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. — **Lieb,** Mikrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. — **Simonis,** Qualitative und quantitative Bestimmungen der Azetylgruppen. — **Biehringer,** Maßanalyse. — **Lockemann,** Qualitative und quantitative Aschenanalyse. — **Arndt,** Die wichtigsten elektrochemischen Methoden.

Lieferung aus Abt. IV, Teil 9: **Haselhoff,** Methoden zur Bestimmung der Zusammensetzung der Nahrungsmittel der Tiere. — **v. Gröer,** Methodik des Ernährungssystems von Pirquet. — **Aron** und **Gratka,** Systematische Fütterungsversuche mit künstlich zusammengesetzten Nährstoffgemischen.

Lieferung aus Abt. V, Teil 2: **Unna,** Chromolyse Sauerstofforte und Reduktionsorte.

Lieferung aus Abt. XIII, Teil 2: **Pfeiffer,** Die Arbeitsmethoden bei Versuchen über Anaphylaxie. — **Dold,** Die Präzipitine und die Methoden der Präzipitation. — **Messerschmidt,** Die Agglutination (einschließlich der Paragglutine). Die Opsonine.

Lieferung aus Abt. XIII, Teil 1: **Methodik der Schutzverleihung bei Tierseuchen: Marxer,** Malleus. — **Aujeszky,** Tollwut. — **Zeller,** Rinderpest. — **Giese,** Lungenseuche. — **Giese,** Bradsot. — **Zeller,** Abortus. — **v. Werdt,** Tetanus. — **v. Werdt,** Rauschbrand.

Lieferung aus Abt. VI, Teil C.: **Völkerpsychologie: Wobbermin,** Religion.

Lieferung aus Abt. I, Teil 1: **Hirsch,** Prüfung der Reagentien. — **Eichwald,** Optisch-aktive Kohlenstoffverbindungen. — **Bauer,** Ungesättigte Verbindungen. — **Schmidt,** Tautomerie und Desmotropie.

Lieferung aus Abt. I, Teil 5: **Zemplen,** Kohlehydrate. Nachweis, Darstellung, Isolierung, Aufbau und Abbauversuche.

I. Zusammengesetzte Einwirkungen, Proteide und ihre Bausteine.

Nukleoproteide.

Nach der Bearbeitung von **Franz Samuely**, Freiburg, neubearbeitet von **H. Steudel**, Berlin.

A. Eigenschaften der Nukleoproteide.

Man bezeichnet mit dem Sammelnamen „N u k l e o p r o t e i d e“ solche Eiweißkörper, die sich aus einer Proteinkomponente und einem Nukleinsäureanteil zusammensetzen.

Die eiweißartige Komponente, die mit der Nukleinsäure in mehr oder weniger fester Verbindung steht, ist nur für eine beschränkte Anzahl dieser Substanzen aufgeklärt. Man fand als solchen Proteinanteil das H i s t o n, weshalb man eine besondere Gruppe als N u k l e o h i s t o n e abgetrennt hat. Alle übrigen Körper tragen schlechtweg den Namen eines Nukleoproteids. Die Mengen der in einem Nukleoproteid vorkommenden Eiweißkörper können sehr schwanken, so daß die Eigenschaften und Zusammensetzung große Unterschiede zeigen.

Von den eigentlichen Nukleoproteiden werden die Para- oder Pseudonukleoproteide oder Nukleoalbumine unterschieden, die zwar auch phosphorhaltig sind, bei der Spaltung aber keine Purin- und Pyrimidinkörper liefern, also auch keine Nukleinsäuren enthalten.

Die Nukleoproteide kommen hauptsächlich in den Zellkernen vor; sie lassen sich meist mit indifferenten Lösungsmitteln extrahieren und aus dem Extrakt mit schwachen Säuren niederschlagen. Da die wässerigen Extrakte der Organe aber meist sehr trübe, opalisierende Flüssigkeiten sind und noch eine Summe von Fermenten enthalten, die natürlich auf die gelösten Substanzen während der Verarbeitung einwirken, so läßt sich über die chemische Reinheit oder über das wirkliche Vorhandensein der als Nukleoproteide bezeichneten Fällungen in der Zelle nichts aussagen.

Man unterscheidet: α - N u k l e o p r o t e i d e. Sie werden bei Anwendung k a l t e r, indifferenter Extraktions- und Lösungsmittel gewonnen.

β - N u k l e o p r o t e i d e, von wesentlich anderer Zusammensetzung als die α-Körper. Sie werden bei Verwendung heißer Lösungsmittel isoliert. Sie entstehen aus den α-Proteiden dadurch, daß

diese in der Hitze in einen koagulierenden Eiweißkörper und das lösliche Proteid zerfallen.

In der Regel begnügt man sich mit der Gewinnung der β-Proteide. Unter dem Einfluß gelinder Hydrolyse mit Hilfe von proteolytischen Enzymen (Pepsin) wird die Eiweißkomponente der Nukleoproteide teilweise gespalten. Es entstehen intermediär sogenannte Nukleine, welche Verbindungen weniger Eiweiß im Verhältnis zur Nukleinsäure enthalten. Die Nukleine werden erst bei tiefer greifender Hydrolyse vollständig aufgespalten; dann wird auch die Nukleinsäurekomponente angegriffen und es treten Purinkörper und freie Phosphorsäure auf.

B. I. Nukleoproteid aus Pankreas.

1. α-Nukleoproteid des Pankreas nach *Umber*[1]).

Die frische, zerkleinerte Pankreasdrüse wird kalt mit physiologischer Kochsalzlösung ausgezogen. Das klare Filtrat wird mit Essigsäure ausgefällt, der entstehende Niederschlag wird häufig mit essigsaurem Wasser aufgerührt und wieder abgegossen. Zuletzt wird er in Wasser aufgeschwemmt, unter Zusatz von möglichst wenig Soda gelöst, schnell filtriert und durch Ansäuern gefällt. Die Umfällung wird wiederholt und schließlich wird mit Alkohol und Äther entfettet und getrocknet. Alle diese Operationen müssen bei Eiseskälte vorgenommen werden.

Der Körper zeigt im Mittel die Zusammensetzung C 51·35, H 6·81, N 17·12, P 1·67, S 1·29, Fe 0·13%.

Durch Kochen des Proteids in Wasser entsteht ein Koagulat. Aus dem Filtrat kann in der unter II beschriebenen Weise ein neues Nukleoproteid gewonnen werden von der Zusammensetzung: C 43·62, H 5·45, N 17·39, P 4·48, S 0·72%. Der Körper ist mit dem nach II dargestellten identisch.

Ein von *Gamgee* und *Jones* nach dieser Methode dargestelltes β-Nukleoproteid aus Schweinepankreas hatte die Zusammensetzung C 45·83, H 6·26, P 5·05, N 17·42%.

2. β-Nukleoproteid des Pankreas nach *Hammarsten*[2]).

Frisches Pankreasgewebe vom Rind wird möglichst rein präpariert, zerschnitten und fein zerhackt. Es wird alsdann rasch mit Wasser aufgekocht und heiß filtriert; man erhält ein hellgelbes klares Filtrat. Nach dem Erkalten säuert man mit Salzsäure oder

[1]) *F. Umber*: Zeitschr. f. klin. Med. **40**. 464 (1900); ebenda. **43**. 282 (1901).

[2]) *O. Hammarsten*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**. 19 (1894); ebenda. **35**. 111 (1902); *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**. 540 (1907).

Essigsäure an, so daß die Lösung 1 bis 2‰ H Cl oder 5 bis 10‰ Essigsäure enthält. Es entsteht sofort ein reichlicher Niederschlag, der sich weiß und flockig zu Boden setzt. Man gießt die Flüssigkeit ab und filtriert oder zentrifugiert den Rest. Der Filterrückstand wird in möglichst wenig Alkali gelöst; statt stark verdünnter Natronlauge kann man Ammoniak verwenden und gelangt so sofort zu farblosen Lösungen. Die Lösung des Alkalinukleoproteids wird erneut mit Essigsäure gefällt. Lösung und Fällung werden drei- bis viermal wiederholt. Der Niederschlag wird zuletzt auf dem Filter mit schwach essigsaurem Wasser, dann mit Alkohol und Äther behandelt und schließlich im Vakuum getrocknet.

Der Körper hat die Zusammensetzung: C 43·62, H 5·45, N 17·39, S 0·72, P 4·48, kein Eisen[1]).

3. α-Nukleoproteid nach *Gamgee* und *Jones*[2]).

Gut zerkleinertes, frisches Pankreasgewebe vom Schwein wird nacheinander mit 50, 75, 90 und 95% Alkohol und schließlich mit Äther extrahiert. Der trockene Rückstand wird in der Kälte entweder mit 20 Teilen Wasser oder mit einer 5%igen Ammoniumazetatlösung ausgezogen. Im ersten Falle wird das klare Filtrat tropfenweise mit Essigsäure bis zu einem Gesamtgehalt von 1% Säure versetzt. Der weiße, flockige Niederschlag wird abgeschleudert, in Wasser aufgenommen und mit Ammoniak bis zu gegen Lackmus neutraler Reaktion versetzt. Der Niederschlag geht schon vor Erreichen des Neutralpunktes in Lösung. Alsdann wird filtriert, mit sehr geringen Mengen Essigsäure erneut gefällt und diese Reinigung durch Lösen und Fällen mehrfach wiederholt.

Die zuletzt entstehende Lösung des Ammonsalzes wird in die fünffache Menge 95%igen Alkohols gegossen.

Hat man Ammoniumazetatlösung zur Extraktion benützt, so werden die klar filtrierten Auszüge sofort mit dem vier- bis fünffachen Volumen 80%igen Alkohols versetzt.

Die in beiden Fällen durch Alkohol erzeugten Niederschläge werden mit großen Mengen 95%igen Alkohols dekantiert, schließlich auf dem Filter mit Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Eine Methode zur Darstellung des β-Proteids nach *Levene* und *Stookey* bietet keine praktischen Vorzüge. Sie extrahieren mit 5% kochender Natriumkarbonatlösung, verfahren sonst in der beschriebenen Weise.

---

[1]) *F. Sauerland*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **64**. 16 (1909).

[2]) *A. Gamgee* und *W. Jones*: *Hofmeisters* Beitr. **4**. 10 (1904).

Eigenschaften der Pankreasnukleoproteide.

α-Proteid: $(\alpha)_D . = + 38{\cdot}1^0$ (37·5) in einer Spur NH_3 gelöst.

Bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure oder Trypsin entstehen Albumosen und Peptone neben Guanylsäure. Ein durch kurzdauernde Pepsinwirkung abgespaltenes Nuklein enthält 5·2% Proteid. Das Proteid ist also nicht absolut fermentresistent unter Abspaltung eines resistenten Nukleins (*Milroy*[1])

β-Proteid: $(\alpha)_D . = + 64{\cdot}4^0$.

Als Spaltprodukte erhält man bei der Hydrolyse natürlich die Spaltprodukte des Eiweißkörpers und der Guanylsäure.

II. Nukleoproteid der Leber nach Wohlgemuth[2]).

2·5 bis 3 *kg* frische Rinderleber werden zu Brei zerdrückt und mit 5 bis 6 *l* Wasser 10 Minuten lang im Blechtopf gekocht. Hierauf wird die Flüssigkeit abfiltriert und die Leber zwei- bis dreimal dieser Prozedur unterworfen. Nach dem Erkalten werden die Filtrate mit verdünnter Essigsäure so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Es bilden sich Flocken, die sich schnell zu Boden senken. Sollte die Flockung ausbleiben, so kann sie durch Erwärmen angeregt werden.

Die Niederschläge werden auf einem Filter gesammelt, mit ganz schwach saurem Wasser gewaschen, mit Alkohol und Äther extrahiert und getrocknet. Ausbeute: 1 *kg* Leber liefert 3 bis 4 *g* Substanz.

Zur Reinigung bis zum konstanten Phosphorgehalt wird der Körper mehrmals in schwacher Sodalösung gelöst und mit Essigsäure wieder gefällt. Zusammensetzung: C 45·22, H 5·72, N 16·67, P 3·06, S 0·637%.

III. Nukleoproteid aus Nebennieren[3]).

Frische Nebennieren werden vom Fett befreit, in der Hackmaschine zerkleinert und unter 70% Alkohol gesammelt. Hat man hinreichend Material, so filtriert man ab und zieht den Gewebebrei nacheinander mit 95%igem Alkohol, absolutem Alkohol und Äther aus. Danach trocknet man und pulverisiert die Gewebsmasse fein. Jede Erwärmung ist bei diesem Verfahren zu vermeiden. Die trockene Drüse läßt man für eine Stunde mit 2% Ammoniak in der Kälte stehen, dann filtriert man durch ein Koliertuch ab und extrahiert

[1]) *Th. Milrog*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 307 (1897).

[2]) *J. Wohlgemuth*: I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 475 (1903); ebenda. II. **42**. 519 (1904).

[3]) *W. Jones* und *G. H. Whipple*: Amer. Journ. of Physiol. **7**. 423 (1902).

den Kolierrückstand in der gleichen Weise mit Wasser. Die vereinigten Auszüge, die nicht durch Filtration oder Ausschleudern zu klären sind, werden in der Kälte tropfenweise bis zu eben saurer Reaktion mit verdünnter Essigsäure versetzt. Die nun stark sich bräunende Lösung läßt einen dunklen spärlichen Niederschlag ausfallen. Das Filtrat desselben wird in 95% Alkohol (vierfaches Volumen) gegossen. Es entsteht eine weiße Fällung, welche mehrmals mit 95% Alkohol aufgerührt, dann mit absolutem Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen wird. Dieses Ammonsalz löst man in Wasser und fällt das freie Proteid mit Essigsäure. Das gefällte Proteid wird mit schwach essigsaurem Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet.

Ausbeute: 6·0 *g* aus 100 *g* trockener Drüsensubstanz. Zusammensetzung: C 45·2 bis 46·8, H 6·10 bis 6·38, P 4·7 bis 5·0, N 17·9 bis 17·4%.

$(\alpha)_D$. = Ca + 48°.

IV. Nukleoproteid aus der Milchdrüse der Kuh nach Odenius[1]).

Die Darstellungsmethode schließt sich eng an die von *Hammarsten* zur Darstellung des β-Nukleoproteids aus Pankreas an.

Zusammensetzung: C 47·02, H 6·09, N 17·27, S 0·28, P 0·94%.

V. Nukleoproteid der Submaxillarisdrüse nach Holmgren[2]).

Der Extraktion des Proteids hat eine Entfernung des Drüsenmuzins vorauszugehen. Die sehr fein zerschnittenen Drüsen werden gut mit Wasser ausgewaschen, hierauf gefroren und in diesem Zustand mit Sand innig verrieben. Zu dieser Masse wird Wasser hinzugesetzt und so oft nach dem Abschleudern jeweils erneuert, bis die letzten Waschflüssigkeiten keine Trübung mehr mit Essigsäure geben. (Ob es gelingt, auf diesem Wege alle Muzinspuren zu entfernen, scheint zweifelhaft.) Hierauf erfolgt eine Extraktion mit 0·05% Ammoniak während 24 Stunden. Mit Essigsäure wird in dem Auszuge das Proteid gefällt und durch mehrfaches Umfällen aus schwach NH_3-haltiger Lösung gereinigt.

Das Proteid enthält 15% N, 2·9% P, eine Kohlenhydratgruppe und Purinbasen.

VI. Nukleoproteid der Thyreoidea nach Oswald[3]).

Das Proteid wird der Schilddrüse zugleich mit dem Thyreoglobulin durch Ausziehen mit physiologischer Kochsalzlösung ent-

[1]) *R. Odenius*: Upsala läkaref. Förhandl. N. F. **5**; *Malys* Jahresber. 1900. 39.

[2]) *E. Holmgren*: Upsala läkaref. Förhandl. N. F. 2; *Malys* Jahresber. 1897. 36.

[3]) *A. Oswald*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**. 64 (1899).

zogen. Die Auszüge werden zur Entfernung des Thyreoglobulins mit Ammonsulfat halb gesättigt und das Filtrat wird durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz beinahe zur Ganzsättigung gebracht. Der sich abscheidende Niederschlag wird abfiltriert, in Wasser gelöst und die Lösung dialysiert. Im Dialysierschlauch bleibt eine Lösung, aus der das Proteid durch Zusatz von 95% Alkohol ausgefällt wird.

Die Methode von *Hammarsten* ist zur Darstellung dieses Nukleoproteids nicht geeignet.

Eigenschaften: Der Körper ist jodfrei; er enthält nur 0·16% Phosphor und liefert mit Pepsinsalzsäure ein ungelöst bleibendes Protein. Es enthält eine Kohlenhydratgruppe, die nicht den Pentosen angehört, und ferner Nukleinbasen.

VII. Nukleoproteid aus Magenschleimhaut und Magensaft nach Pekelharing[1]), Nencki und Sieber[2]).

Darstellung nach *Pekelharing* aus Schleimhaut.

Die Schleimhaut von 10 Schweinemägen (Fundusteil) wird zerhackt und mit 6 *l* 0·5%iger Salzsäure 5 Tage lang bei 37° digeriert. Die Flüssigkeit wird über einem mit Filtrierpapierschnitzeln bedeckten Konus oder einer Filterplatte unter vorsichtigem Saugen abfiltriert. Die völlig geklärte Verdauungsflüssigkeit wird in Pergamentschläuchen gegen strömendes Wasser 24 Stunden lang dialysiert. Nach dieser Zeit trübt sich der Schlauchinhalt; durch Abschleudern wird eine Abscheidung gewonnen. Diese wird eine Stunde lang mit 30 bis 40 cm^3 0·2%iger Salzsäure bei 30° digeriert und bei dieser Temperatur danach filtriert. Das klare Filtat von gelblicher Farbe trübt sich beim Abkühlen. Es wird dann abermals 15 bis 20 Stunden lang dialysiert und der Schlauchinhalt filtriert Der Filterrückstand wird abermals unter den beschriebenen Bedingungen in 0·2% H Cl gelöst und nun gegen destilliertes Wasser dialysiert; dann wird der entstandene, meist feinkörnige Niederschlag auf ein Filter gebracht, mit wenig destilliertem Wasser gewaschen, vom Filter entfernt und über Schwefelsäure getrocknet.

Aus der ursprünglichen, zur ersten Dialyse angesetzten Lösung dieses Körpers scheidet sich bei der ersten Dialyse nicht der gesamte Körper ab. Der noch in Lösung befindliche, dem obigen identische Bestandteil wird folgendermaßen gewonnen:

Die Flüssigkeit wird ausgeschleudert und mit Ammoniak und basischem Bleiazetat versetzt. Der voluminöse Niederschlag wird filtriert, vom Filter entfernt und mit einer gesättigten Oxalsäurelösung versetzt. Nach einigem Stehen scheidet sich vom Bleioxalat

[1]) *C. A. Pekelharing*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 233 (1896).

[2]) *M. Nencki* und *N. Sieber*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 291 (1901).

eine gelbbraune Flüssigkeit ab, die filtriert wird. Die Menge derselben beträgt 200 bis 400 *cm³*. (Die Menge des Dialysates beträgt 6 bis 7 *l*.) Das stark saure Filtrat wird gegen Leitungswasser dialysiert. Der Niederschlag, der im Schlauchinhalt ausfällt, wird durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt, bei 37°, wie oben beschrieben, in 0·2% H Cl gelöst, durch Dialyse gegen destilliertes Wasser erneut gefällt und in der schon beschriebenen Weise gewaschen und getrocknet.

Die trockene, bräunlich gefärbte Substanz ist pulverisierbar, aber leicht hygroskopisch.

Ausbeute 0·5 *g* aus 10 Magenschleimhäuten.

Eigenschaften: Der Körper enthält 10% Phosphor im Maximum. Der Phosphorgehalt schwankt mit der Reinheit, 0·6% im Minimum. Der Körper ist in Wasser und verdünnter Kochsalzlösung löslich. Beim schnellen Erhitzen in wässeriger Lösung zerfällt er in ein bei saurer Reaktion unlösliches Nukleoproteid (β-Proteid ?), in eine in warmem Alkohol lösliche phosphorhaltige Substanz und in eine Albumose.

Das Nukleoproteid kann abfiltriert werden. Es wird auf dem Filter mit Wasser gewaschen, bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in der Waschflüssigkeit, dann mit 85% Alkohol bei 45° digeriert, bei dieser Temperatur filtriert und wiederholt mit warmem Alkohol gewaschen. Es folgt eine Nachbehandlung auf dem Filter mit kaltem absoluten Alkohol und mit Äther und Trocknen über $CaCl_2$ oder H_2SO_4.

Der Körper hat die Eigenschaften eines Nukleoproteids und enthält 0·31 bis 0·33% Phosphor bei 0·46% Asche. Er spaltet beim Kochen mit Säure Nukleinbasen ab, die in der Kälte mit ammoniakalischer Silberlösung fällbar sind. Ein Kohlenhydratkomplex fehlt.

In welcher Beziehung dieses zweite Proteid zu dem oben beschriebenen Körper steht, ist nicht aufgeklärt.

VIII. Nukleoproteid aus Milz nach Levene und Mandel[1]).

Die zerkleinerten Rindermilzen werden mit 0·25% Natriumbikarbonatlösung extrahiert. Die Filtrate dieser Auszüge werden mit Essigsäure angesäuert. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter so lange mit Wasser gewaschen, bis die Biuretreaktion im ablaufenden Waschwasser ausbleibt.

Anstatt der Extraktion mit Natriumbikarbonat kann das Gewebe auch mit kochendem Wasser behandelt werden. Die Reini-

[1]) *P. A. Levene* und *J. A. Mandel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 151 (1906).



gung kann in der oft beschriebenen Weise durch Umfällen mit verdünnter Essigsäure aus schwach alkalischer Lösung geschehen. Die Präparate werden durch Behandeln mit Äther und Alkohol nach Möglichkeit entfettet.

Das Produkt enthält 1·18 bis 1·85% Phosphor.

Nukleoproteid aus Thymus.

Die Proteide dieser Herkunft sind sehr eingehend studiert worden. Ein zuerst von *Lilienfeld* in einfacher Weise dargestelltes Proteid erwies sich als ein Nukleohiston.

IX. Darstellung des Nukleohistons nach Lilienfeld[1]).

Fein zerhackte Thymusdrüsen werden in der Kälte mit Wasser extrahiert, dem man etwas Chloroform zugefügt hat. Die kolierten und ausgeschleuderten Auszüge, die nicht vollkommen klar zu bekommen sind, sondern immer milchig getrübt bleiben, werden mit verdünnter Essigsäure vorsichtig ausgefällt. Es fällt ein Niederschlag, der gesammelt und mit Alkohol und Äther getrocknet wird, das sogenannte Nukleohiston. Die Analysenzahlen, die *Lilienfeld* und übereinstimmend damit *Steudel*[2]) gefunden haben, sind folgende:

C 48·38, H 6·92, N 16·85, P 3·20, S 0·72.

Der Phosphor ist im Nukleohiston nur in Form der Thymonukleinsäure enthalten. Bei dem Abbau mit Natronlauge erhält man sämtlichen Phosphor in Form dieser Nukleinsäure.

X. Darstellung des Nukleohistons aus Thymus nach Bang[3]).

Der Wasserauszug der fein zerhackten Thymusdrüsen wird mit Chlorkalzium gefällt; die Lösung wird auf 0·2% $CaCl_2$ gebracht. Der Niederschlag wird nach dem Behandeln mit Alkohol und destilliertem Wasser in 2%iger Kochsalzlösung gelöst und nach dem Filtrieren durch Verdünnen mit dem gleichen Volum Wasser Nukleohiston-Alkali ausgefällt. Die Verbindung wird durch Umfällen mit Chlorkalzium in 0·2% Lösung gereinigt und als Kalziumsalz erhalten.

In der Lösung des Nukleohistons ruft Ammonsulfat einen Niederschlag hervor, der sich im Überschuß löst, um bei Sättigung mit Ammonsulfat (von 70 Sättigungsprozent an) wieder aufzutreten. Durch Alkohol werden Nukleohistonalkalilösungen nur

[1]) *L. Lilienfeld*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 473 (1895).
[2]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 207 (1913).
[3]) *J. Bang*: *Hofmeisters* Beitr. **4**. 115 (1904); ebenda. **4**. 362 (1904).

in Gegenwart von etwas Kochsalz gefällt, auch das Koagulieren beim Kochen erfolgt nur in Gegenwart von Kochsalz.

Nukleohistonlösungen sind rechtsdrehend. *Gamgee* und *Jones*[1]) fanden $\alpha)_D$. = + 37·5°. Bei der Elektrolyse einer Nukleohistonalkalilösung scheidet sich das Nukleohiston an der Anode ab[2]).

Huiscamp und *Malengrean* und später *Bang* wiesen nach, daß neben dem Nukleohiston ein Nukleoproteid vorhanden ist, dessen Eiweißkomponente kein Histon ist. Die von den 3 Autoren gewonnenen Präparate erwiesen sich als identisch. Die Darstellungsmethode von *Bang* führt wohl zu den reinsten Präparaten.

XI. Methode von Bang[3]).

Frisches Thymusdrüsengewebe wird in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 1·5 bis 2 *l* 0·9%iger Na Cl-Lösung versetzt und damit 24 bis 48 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Bei heißer Jahreszeit wird zweckmäßig etwas Chloroform als Antiseptikum zugegeben. Nach dieser Zeit filtriert man und gewinnt eine milchigweiße Flüssigkeit von deutlich amphoterer, fast mehr alkalischer Reaktion. Durch Ausschleudern oder Filtrieren gelingt eine Klärung nicht, In dieser Lösung, in der Kalziumchlorid keinen Niederschlag hervorruft, erzeugt man durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Essigsäure eine Fällung. Diese Fällung ist meist bei einem Gesamtgehalt von 1% Essigsäure oder 0·2% Salzsäure beendet. (Der Niederschlag ist im Säureüberschuß leicht löslich.)

Der gelblichweiße Niederschlag wird auf ein Filter gebrach und mehrmals mit Wasser ausgewaschen, zuletzt mit Alkohol und dann mit Äther übergossen und bei 100° getrocknet. Es resultiert ein feines, gelbweißes Pulver.

Zusammensetzung: C 49, H 6·35, N 16·51, P 1·22 bis 1·01%, Asche 2·36%.

Durch mehrmaliges Kochen mit Alkohol wird der P-Gehalt nicht verändert.

XII. Darstellung nach Huiscamp[4]).

Man extrahiert die fein zerhackte frische Thymusdrüse (150 bis 200 *g*) 12 bis 24 Stunden lang mit 500 bis 600 cm^3 kaltem Wasser. Zu dem durch Kolieren und Ausschleudern von Formbestandteilen

[1]) *A. Gamgee* und *W. Jones: Hofmeisters* Beitr. 4. 10 (1904).
[2]) *W. Huiscamp:* Zeitschr. f. physiol. Chem. 32. 145 (1901).
[3]) *J. Bang*: I. und II. *Hofmeisters* Beitr. 4. 115 (1904); III. ebenda. 4. 362 (1904).
[4]) *W. Huiscamp*: Zeitschr. f. physiol. Chem. 32. 145 (1901).

befreiten Auszuge setzt man eine Lösung von Ca Cl_2 (1 *cm*³ einer 10%igen Ca Cl_2-Lösung auf 100 *cm*³ Lösung). Es entsteht ein reichlicher Niederschlag von Nukleohiston. Von diesem wird abfiltriert. Das Filtrat enthält das gelöste Nukleoproteid, das durch Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure ausgefällt und nach der wiederholt beschriebenen Weise durch Umfällen gereinigt wird.

Ein Teil dieses Körpers kann auch als Kalziumnukleoproteid aus einer Lösung in ganz verdünntem Ammoniak mit Ca Cl_2 gefällt werden. Der Niederschlag wird filtriert, mit Alkohol frei von Ca Cl_2 gewaschen, mit Äther versetzt und getrocknet.

Das Nukleoproteid gibt eine starke Reaktion nach *Millon* und *Adamkiewicz*.

Zusammensetzung: C 50·09, H 7·18, N 16·11, P 0·97, Asche 3·11%.

Kalziumnukleoproteid: C 49·93, H 7·09, N 15·85, P 0·94, S 1·23, Ca 1·33%.

Die Methode der Darstellung von *Malengreau*[1]) beruht auf Aussalzung des Nukleoproteids mit Ammonsulfat aus einer Lösung in sehr verdünntem Alkali. Die Methode bietet für die Reindarstellung keine Vorteile gegenüber den bereits genannten.

Eigenschaften des Nukleoproteids: Für das nach *Bang* dargestellte Proteid ergaben sich folgende Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat im Kochsalzauszug der frischen Drüse: Bei einer Sättigung von 30% tritt eine wirkliche Fällung ein (bisweilen schon bei 20 bis 25% Sättigung). Die Abscheidung einer ersten Fraktion ist mit 40% beendet, mit 46 bis 60% scheidet sich eine zweite, oberhalb 60 bis 100% eine dritte Fraktion ab. Kochsalz und Magnesiumsulfat fällen bei Halbsättigung.

Mit Pepsinsalzsäure entsteht ein Nuklein, das Phosphor und Purinbasen enthält. Die Bildung des Nukleins bleibt aber aus, wenn das Nukleoproteid vorher mit Salzsäure behandelt oder gelöst war.

Eine Pentosengruppe existiert in dem Proteid nicht. Durch Behandeln mit Salzsäure oder Alkali erleidet das Nukleoproteid eine Spaltung. Es geht ein Albuminat in Lösung, zurück bleibt ein Nuklein.

Das in Salzsäure unlösliche Nuklein hat die Zusammensetzung N 16·58, P 2·49 bis 2·69%. Wird das Nukleoproteid mit 0·04%

---

[1]) *F. Malengreau*: La Cellule. **17.** 339; Sur les Nucléines du Thymus; ebenda. **19.** 285.

Natronlauge ausgezogen, so geht ein Teil in Lösung. Wird diese Lösung filtriert und mit Essigsäure gefällt, so entsteht ein Niederschlag, der gereinigt und getrocknet 16·57% N und 2·10 bis 2·38% P enthält. Es handelt sich hier wohl um das gleiche Nuklein, das bei der Salzsäurebehandlung ungelöst zurückbleibt.

Identifizierung und Unterscheidung des Nukleoproteids vom Nukleohiston des Thymus. Nach *Bang* verfährt man so, daß man das mit Essigsäure aus dem Kochsalzextrakt oder der schwach alkalischen Lösung gefällte Proteid mit kalter 0·3%iger Salzsäure behandelt. Man gewinnt so einen Salzwasserauszug, der filtriert wird und mit dem man die typischen Histonreaktionen ausführt. (Siehe Histone.) Entsteht beim Abstumpfen der Reaktion mit NH_3 schon vor wirklicher Alkaleszenz, d. h. bei schwach saurer oder amphoterer Reaktion eine Fällung, so handelt es sich um ein Albuminat. Damit ist die Histonnatur in dem ursprünglichen Nukleoproteid ausgeschlossen. Entsteht aber bei vorsichtigem Ammoniakzusatz ein Niederschlag bei eben deutlicher alkalischer Reaktion, so liegt ein Histon vor, das durch weitere Reaktionen leicht identifizierbar ist.

XIII. Nukleoproteide in lymphatischen Organen nach Bang[1]).

Nach der für das Proteid der Thymus gültigen Methode gelingt auch der Nachweis, daß die Lymphdrüsen und die weißen Blutkörperchen ein Nukleoproteid neben oder ohne gleichzeitig vorkommendem Nukleohiston enthalten.

Lymphdrüsen. Man stellt sich, wie bei der Thymus, in der Kälte einen Kochsalzauszug (0·9% Na Cl) der fein zerkleinerten Drüsen her. Der Auszug wird abzentrifugiert und filtriert. Er stellt eine durchsichtige, braun gefärbte, amphoter reagierende Flüssigkeit dar, die wie der Thymusauszug mit $CaCl_2$ keine Fällung gibt. Mit ganz verdünnter Essigsäure wird ein flockiger Niederschlag gefällt, der wie gewöhnlich gereinigt wird. Der Körper enthält 0·83% Phosphor.

Seine Identifizierung als Nukleoproteid geschieht durch Spalten mit 0·3% Salzsäure und Nachweis eines Albuminates in der filtrierten salzsauren Lösung mit Hilfe der Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung zu 20% oder durch Ausfällen beim Abstumpfen der sauren zu einer fast neutralen Reaktion.

In den Lympfdrüsen beträgt die Menge des Proteids 1·06% der Drüsensubstanz. Im Knochenmark läßt sich nach dieser Methode kein Nukleoproteid nachweisen.

---

[1]) *J. Bang*: III. *Hofmeisters* Beitr. 4. 362 (1904).

XIV. Weiße Blutkörperchen[1]).

Am abgeschleuderten Blut setzen sich die weißen Blutkörperchen über den roten als eine Art Speckhaut ab, die mit dem Platinspatel abgeschabt wird. Man schwemmt die Masse in physiologischer Kochsalzlösung auf und schleudert sofort wieder aus. Der Leukozytenniederschlag wird alsdann mit 0·9% Kochsalzlösung oder mit Wasser in der Kälte ausgezogen. Es entsteht eine Lösung, in der Essigsäure eine Fällung erzeugt. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und in 0·5% HCl übertragen. Es entsteht ein klares Filtrat, in dem in der beschriebenen Weise durch Abstumpfen reichlich Eiweiß (kein Histon) ausfällt.

Nach einer Bestimmung der Albuminatmenge finden sich fast 80% der festen Stoffe der Leukozyten als Albuminat wieder.

Über ein zweites Nukleoproteid im sogenannten Plasmaniederschlag (siehe bei Nukleoproteid des Blutserums. Blutanalyse).

C. I. Identifizierung eines Proteins als Nukleoproteid.

Man überzeugt sich, daß ein in Alkalien löslicher, durch verdünnte organische Säuren fällbarer Körper vorliegt. Derselbe wird auf diese Weise der Ausfällung von anderen Proteinen getrennt und nach Möglichkeit gereinigt. Da er seine Löslichkeitseigenschaften mit manchen Nukleoalbuminen oder Mukoiden teilt, so bestimmt man qualitativ die Gegenwart von Phosphor. Fällt dieser Nachweis positiv aus, so ist eine Muzinsubstanz auszuschließen. Von den „Nukleoalbuminen" unterscheidet sie die Anwesenheit von Nukleinbasen in der Hydrolysenflüssigkeit des fraglichen Körpers. Man zerkocht die Substanz mit 5% Schwefelsäure, neutralisiert hierauf mit Barythydrat und filtriert noch heiß vom Baryumsulfat ab. Das klare Filtrat versetzt man mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Eine Fällung kündet die Gegenwart von Purinbasen an. Das wirkliche Vorhandensein einer Nukleinsäure in den Nukleoproteiden kann nur durch die Darstellung der Nukleinsäure und ihre eventuelle quantitative Bestimmung bewiesen werden. Hierfür ist die Darstellungsmethode nach *Neumann*, soweit es sich um Thymonukleinsäure handelt, geeignet, die Reinheit der Nukleinsäure wird durch die Bestimmung des Verhältnisses P : N im Niederschlag nachgewiesen[2]). Solche

[1]) *J. Bang*: III. *Hofmeisters* Beitr. **4**. 362 (1904).

[2]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**. 305 (1911); ebenda. **73**. 471 (1911).

Bestimmungen sind bisher aber nur am Nuklein aus Fischsperma und am Nukleohiston aus Thymus nach *Lilienfeld* ausgeführt.

II. Untersuchung der Spaltprodukte der Nukleoproteide.

Die durch tiefgreifende Hydrolyse entstehenden Spaltprodukte müssen nach den Methoden zur Untersuchung der Nukleinsäuren und der Eiweißkörper untersucht werden. Man wird möglichst zu vermeiden suchen, das Nukleoproteid als solches zu zersetzen, weil man dann ein gar zu buntes Gemisch von Spaltkörpern bekommt. Zweckmäßiger ist es, zunächst eine Trennung in Nukleinsäure und Eiweißkörper vorzunehmen und die einzelnen Teile für sich zu untersuchen.

Ob die als Spaltprodukte der Nukleoproteide beschriebenen Nukleine Anspruch auf besondere Eixstenz haben, mag dahingestellt bleiben. Wahrscheinlich handelt es sich bei ihnen um Verbindungen, bei denen nur das Verhältnis Nukleinsäure zu Eiweißkörper zugunsten der Nukleinsäure verschoben ist. Eine solche Änderung ist bequem z. B. durch Pepsinverdauung zu erreichen.

D. Darstellung eines Nukleins direkt aus Geweben.

Man versetzt gut zerkleinerte Organe mit stark verdauendem künstlichen oder natürlichen Magensaft und läßt das Gemisch bei 37° im Brutschrank bis zum Verschwinden des koagulablen Eiweißes stehen. Es hinterbleibt ein Bodensatz, der aus Nuklein und Albuminoiden besteht. Diesen Rückstand filtriert man ab und wäscht ihn mit Wasser bis zum Verschwinden einer starken Biuretreaktion. Die Nukleine sind nicht ganz unlöslich in Wasser, daher nicht zu lange waschen. Den Rückstand zieht man mit sehr verdünntem Ammoniak (0·05%) aus. Das Filtrat wird mit Salzsäure versetzt, wobei ein Niederschlag entsteht, der zur Befreiung von Eiweißresten abermals mit Magensaft verdaut wird.

Der nunmehrige Rückstand wird auf dem Filter gut ausgewaschen, mehrmals aus stark verdünnter Lauge mit verdünnter Essigsäure umgefällt, mit Alkohol und Äther getrocknet.

Besonders die Behandlung mit Alkohol und Äther hat im Extraktionsapparat so lange zu geschehen, bis die letzten Reste von Lipoiden, Lezithin und Organphosphatiden entfernt sind. Am besten geht man bei der Darstellung eines Nukleins von einem bereits gereinigten Nukleoproteid aus.

Das Nuklein aus den Spermatozoenköpfen hat die Zusammensetzung eines Salzes der Nukleinsäure und Protamin. Man kann[1]) dies schließen aus dem Vergleich mit künstlich hergestelltem nukleinsauren Protamin. Das Verhältnis von N : P ist in beiden Körpern = = 1 : 3·23; sie unterscheiden sich allerdings physikalisch, so daß in ihrem Bau noch Differenzen bestehen müssen.

[1]) *H. Steudel:* Z. f. physiol. Chemie **83**. 71 (1911).

Darstellung und Nachweis der Nukleinsäuren.

Von **H. Steudel,** Berlin.

A. 1. Methoden zur Darstellung der Thymusnukleinsäure.

Echte Nukleinsäuren, d. h. Nukleinsäuren, die nach dem Typus der Nukleinsäure aus der Thymusdrüse aufgebaut sind, kommen in den Zellkernen fast aller Organe vor. Ihre Menge ist dort aber für gewöhnlich nur sehr gering, so daß die Isolierung einer reinen und unzersetzten Nukleinsäure z. B. aus Leber umständlich ist. Die meisten Organe eignen sich deshalb nicht zur präparativen Darstellung der Nukleinsäure. Ein gutes Ausgangsmaterial für die Gewinnung der echten Nukleinsäure ist nur das reife Fischsperma (*Miescher*, *Noll*, *Steudel*[1]), die Thymusdrüse (*Kossel* und *Neumann*[2]) und von pflanzlichen Zellen die Hefe (*Hoppe-Seyler*, *Altmann*[3]). Am einfachsten liegen die Verhältnisse beim reifen Fischsperma; die Spermatozoenköpfe enthalten außer Nukleinsäure und Protamin nichts Wesentliches, aber auch aus den Zellen der Thymusdrüse läßt sich mit Leichtigkeit die gleiche Nukleinsäure wie aus den Spermatozoen der Fische darstellen, trotzdem hier die physiologisch-chemischen Verhältnisse durch die Gegenwart von Nukleoproteiden, von Nukleohiston usw. theoretisch komplizierter liegen.

a) Darstellung der Thymusnukleinsäure nach *Neumann*[4]).

1 *kg* frische, rein präparierte Thymusdrüsen werden in schwach essigsaurem Wasser rasch aufgekocht. Die Operation hat nur den

---

[1]) *Fr. Miescher*: Die Spermatozoen einiger Wirbeltiere. Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel. 1874. Auch Gesammelte Abhandlungen. **2**. 55. Leipzig, *F. W. Vogel*, 1897; Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Gesammelte Abhandlungen. **2**. 359; *Alfred Noll*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**. 430 (1898); *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 426 (1906); **49**. 406 (1906).

[2]) *A. Kossel* u. *A. Neumann*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **26**. 2753 (1895); **27**. 2215 (1896).

[3]) *F. Hoppe-Seyler*: Med.-chem. Untersuchunegn. Berlin, *A. Hirschwald*, 1866 bis 1871, 500; Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**. 427 (1878/79); *R. Altmann*: Arch. f. (Anat. und) Physiol. 525 (1889).

[4]) *A. Neumann*: Arch. f. (Anat. und) Physiol. 374 (1898); ebenda. Supplementband. 552 (1899).

Zweck, die nun folgende Zerkleinerung der Drüsen zu erleichtern. Sobald die Drüsen durch und durch hart geworden sind, hört man mit dem Sieden auf und gibt nun das Material durch eine gute Fleischhackmaschine. Dann wird der feingehackte Brei mit einer 1·7%igen Natronlauge im siedenden Wasserbade erwärmt; dazu nimmt man auf 1 *kg* Reinthymus 2 *l* Wasser und 100 cm^3 33%iger Natronlauge, dem man zweckmäßig noch 200 *g* Natriumazetat hinzufügt. Das Erwärmen nimmt man am besten in einem gut glasierten Emailtopf vor, den man in einen größeren Topf mit siedendem Wasser hineinhängt. Ein gut passender Deckel erfüllt vollkommen den Dienst eines Rückflußkühlers. Nach etwa halbstündigem Erhitzen hat sich alles bis auf geringe Reste von Bindegewebe mit brauner Farbe gelöst, und will man die gelatinierende Säure a haben, so unterbricht man jetzt das Erhitzen; will man die nicht gelatinierende Form b haben, so erwärmt man noch zirka 1 bis 1½ Stunden weiter. Die fernere Verarbeitung ist in beiden Fällen dieselbe. Man neutralisiert die Natronlauge — auf je 100 cm^3 33%iger Na OH 150 cm^3 50%iger Essigsäure —, läßt den entstehenden Niederschlag von Eiweiß in der Wärme sich absetzen, gießt zuerst die überstehende klare, hellgelbe Flüssigkeit und dann den Bodensatz auf ein Faltenfilter, das in einem Heißwassertrichter liegt. Nachdem man dann die Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingedampft hat (2 *l* Ausgangsvolumen auf etwa 0·5 *l*), läßt man sie auf etwa 40° erkalten und gießt sie unter Umrühren in das gleiche Volumen 96%igen Alkohols. Dabei fällt das nukleinsaure Natron als zähe, fadenziehende Masse aus. Nach dem vollständigen Erkalten und Klarwerden gießt man die Flüssigkeit ab, filtriert den Niederschlag durch Leinwand und löst ihn in Wasser (in unserem Falle 500 cm^3). Nun erhitzt man auf dem Wasserbade, bis sich aus der trüben Flüssigkeit ein leicht filtrierbarer Niederschlag abgeschieden hat und die Lösung klar geworden ist. Man filtriert und fällt mit Alkohol. Das reine Natronsalz gibt mit Alkohol keine Fällung; dieselbe entsteht jedoch, wenn man eine konzentrierte Lösung von Natriumazetat in geringer Menge hinzufügt. Nachdem man eventuell durch nochmaliges Umlösen reines Natronsalz gewonnen hat, kann man zwecks Konservierung dieses mit absolutem Alkohol und Äther tocknen. Man erhält dann ein schneeweißes, staubendes Pulver, das sich beliebige Zeit hält. Zur Gewinnung der freien Säure löst man das Natronsalz mit Wasser und fällt durch verdünnte Salzsäure; die Substanz wird dann mit absolutem Alkohol getrocknet.

Gießt man die Lösung des gereinigten Natronsalzes in die dreifache Menge Alkohol, den man vorher mit konzentrierter Salzsäure (2 cm^3 auf 100 cm^3 Alkohol) versetzt hat, so erhält man eine weiße Fällung der freien Säure, die sich langsam zu Boden setzt.

Die klare Flüssigkeit wird alsdann abgegossen und der Niederschlag ebenfalls einige Zeit unter starkem Alkohol stehen gelassen.

In beiden Fällen wird nach dem Filtrieren so lange mit absolutem Alkohol nachgewaschen, bis die saure Reaktion verschwunden bezw. das Filtrat chlorfrei ist.

Will man aus dem Natronsalz das Kupfersalz bezw. ein anderes schwerlösliches Metallsalz gewinnen, so ist es zweckmäßig, die siedend heiße Lösung des nukleinsauren Salzes in dünnem Strahl in die ebenfalls siedend heiße Metallsalzlösung hineinzugießen (*Steudel*). Nur so erreicht man eine vollständige Umsetzung, weil unter anderen Umständen das schwerlösliche nukleinsaure Kupfer bezw. Blei, Zink usw. jeden neu in die Reaktionsflüssigkeit fallenden Tropfen der Metallsalzlösung bezw. der Lösung von nukleinsaurem Natron mit einer dicken undurchdringlichen Hülle überzieht, die eine weitere Einwirkung verhindert und die Präparate verunreinigt.

Sowohl bei der Darstellung des Natronsalzes sowie des Kupfersalzes ist darauf zu achten, daß zum Schluß das Wasser sorgfältig aus der feinverteilten Substanz durch Alkohol entfernt wird; das geschieht am besten durch wiederholtes Verreiben unter Alkohol. Man erhält sonst leicht glasige oder harzige, zum Schluß steinharte Massen, die nicht weiter verarbeitet werden können oder doch noch einmal gelöst und wieder umgefällt werden müssen. Das Kupfersalz kann man auch an der Luft trocknen lassen, wenn man nur auf sorgfältige Zerbröckelung der größeren Stücke dauernd achtet.

Ausbeute an reiner Nukleinsäure nach diesem Verfahren: Aus je 1 *kg* Reinthymus 30 bis 35 *g*.

Von *Neumann* wurden nach dieser Methode Nukleinsäuren erhalten aus Thymus, Milz, Pankreas und Stierhoden; nach *Steudel* eignet sie sich auch zur Darstellung der Nukleinsäure aus Fischsperma.

Handelt es sich darum, die Nukleinsäure in großer Reinheit zu haben oder die a- und b-Modifikation der Thymusnukleinsäure, die man nach *Neumann* gemischt erhält, getrennt zu gewinnen, so hält man sich zweckmäßig an die von *R. Feulgen* empfohlenen Modifikationen der *Neumann*schen Methode.

b) Darstellung der Nukleinsäure nach *Schmiedeberg*[1]).

Möglichst von Blut und Bindegewebe befreite und feingehackte Thymusdrüsen werden mit dem mehrfachen Volumen Wasser angerührt und in einem Glasballon stark geschüttelt, bis die Drüsensubstanz eine ziemlich gleichmäßige schleimige Beschaffenheit an-

[1]) *Schmiedeberg*: Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **57**. 321 (1907).



genommen hat. Sodann wird die Masse mit Essigsäure neutralisiert, doch so, daß sie auch beim Erhitzen etwas sauer reagiert. Man erhitzt zum Sieden, bis das Eiweiß koaguliert und die Flüssigkeit klar geworden ist, die man dann abfiltriert. Die abgekochte, mit heißem Wasser ausgewaschene und von der Flüssigkeit abgepreßte Drüsenmasse wird mit einer mäßigen Menge halbgesättigter Kochsalzlösung zum Sieden erhitzt und letzteres so lange unterhalten, bis die anfänglich gallertartige Masse sich unter Abscheidung von Gerinnseln verflüssigt hat. Hierauf wird in einem Heißwassertrichter filtriert und das Filtrat, welches gelatiniert, noch heiß mit dem drei- bis vierfachen Volum Alkohol versetzt, wodurch das nukleinsaure Natrium gefällt wird, während Eiweißsubstanzen usw. in Lösung bleiben. Durch Umfällen aus siedender Kochsalzlösung mit Alkohol kann das nukleinsaure Natron völlig frei von Eiweiß erhalten werden. Es besteht aber jetzt, zum Teil wenigstens, noch aus der gelatinierenden Nukleinsäure a. Um sie in die nicht gelatinierende b überzuführen, wird sie mit einer mäßigen Menge Kochsalzlösung von 10 bis 15% so lange im Sieden erhalten, bis sich eine geringe Menge einer flockigen Substanz abgeschieden hat und eine herausgenommene Probe beim Erkalten nicht mehr gelatiniert. Dennoch enthält die Lösung noch einen Rest der gelatinierenden Modifikation, den durch längeres Sieden umzuwandeln nicht zweckmäßig ist, weil dabei die Nukleinsäure leicht eine gelbliche Färbung annimmt.

c) Darstellung des nukleinsauren Natriums nach *Feulgen*[1]).

In einem emaillierten Kessel bringt man 10 *l* gewöhnliches Wasser zum Sieden, gibt 10 *cm*³ Eisessig hinzu und trägt 3 *kg* reinpräparierte und in handtellergroße Stücke zerschnittene Thymusdrüsen vom Kalbe ein. Man läßt das heiße Wasser 20 Minuten einwirken und sorgt durch Anwendung eines großen Brenners dafür, daß das Wasser nach dem Einbringen der Drüsen bald wieder ins Kochen kommt. Nach Ablauf der Zeit gießt man das kochende Wasser ab, breitet die Drüsen auf einem Tuche aus und hackt sie in einer Fleischhackmaschine in einen tarierten etwa 6 *l* fassenden Kochtopf hinein. Man bringt nun das Gewicht der Drüsensubstanz mit Wasser wieder auf 3 *kg* und verrührt die Masse zu einem gleichmäßigen Brei. Mit dem Wasserzusatze gehe man unter stetem Umrühren sehr allmählich vor, es werden so mit Sicherheit Knoten vermieden. Jetzt gibt man 300 *g* Natriumazetat hinzu, setzt den Topf in ein lebhaft siedendes Wasserbad (wozu eventuell ein größerer Kessel dienen kann) zugedeckt mit einer mit kaltem Wasser ge-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**. 261 (1914).



füllten Abdampfschale, welche als Rückflußkühler wirkt, und bringt so dessen Inhalt unter gelegentlichem Umrühren mit einem kräftigen Holzscheit auf eine Temperatur von 80° (Dauer zirka eine halbe Stunde).

Wenn diese Temperatur erreicht ist, gibt man unter Umrühren 150 *cm*³ 33%ige Natronlauge (D. A. B. V.) hinzu. Die Masse wird im ersten Augenblicke sehr zähflüssig, in wenigen Minuten jedoch wieder dünnflüssig, und im Laufe der ersten 10 Minuten tritt vollkommene Verflüssigung ein. Wenn dies erreicht ist, ist ein Umrühren nicht mehr erforderlich. Nach einer halben Stunde vom Einbringen der Natronlauge an gerechnet, rührt man 75 *g* Talkum in die Flüssigkeit hinein und neutralisiert im Wasserbade mit 50%iger Essigsäure, bis die Reaktion eben nicht mehr alkalisch ist; die Masse reagiert dann, da eine breite Zone amphoterer Reaktion durchlaufen wird, schon deutlich sauer. (Erforderlich zirka 200 *cm*³). Man setzt jetzt den Kessel auf eine Asbestplatte über einen großen Brenner und erhitzt unter Umrühren bis zum Sieden. In diesem Stadium fügt man 50 *cm*³ Amylalkohol (iso) hinzu, worauf der Schaum sofort verschwindet, der sonst ein Absetzen der Eiweißderivate unmöglich machen würde. Man kocht sodann einmal auf, setzt den Topf zum Absetzen in das siedende Wasserbad zurück, gießt nach Verlauf einer Viertelstunde die überstehende fast klare Flüssigkeit in einen 10 *l* fassenden Kochkessel und koliert den Rest durch ein im Heißwassertrichter liegendes Koliertuch in die Hauptmenge hinein. Der Rückstand wird mit 0·5 *l* Wasser ausgekocht und abermals koliert. Die inzwischen zu einer festen Gallerte erstarrte Kolatur wird im siedenden Wasserbade oder auch auf der Asbestplatte über freier Flamme bis auf 80° erwärmt und im Kochtopfe mit 5 *l* siedendem Alkohol unter Umrühren versetzt. Es entsteht sofort ein schöner schneeweißer Niederschlag von noch eiweißhaltigem, nukleinsaurem Natrium, der Neigung hat, sich in wenigen Augenblicken zu Boden zu setzen. Man gießt Flüssigkeit samt Niederschlag in einen angewärmten Glaszylinder, läßt eine halbe Stunde absitzen, hebert die überstehende, fast klare, schwach braun gefärbte Mutterlauge ab, wirbelt den Niederschlag durch Umschwenken auf und saugt ihn über einem doppelten weichen Filter ab, unter Zuhilfenahme eines Waschalkohols, bestehend aus 300 *cm*³ Wasser, 600 *cm*³ Alkohol und 20 *cm*³ konzentrierter Natriumazetatlösung. Gegen Schluß des Absaugens drücke man die Masse mit einem Pistill fest zusammen, zerschneide den entstandenen etwas elastischen Kuchen samt Filter mittels eines mit dem Waschalkohol befeuchteten Messers in Streifen und bringe diese in einen 2 *l* fassenden trockenen Kolben. Wird er jetzt kräftig geschüttelt, so zerfallen die Streifen zu einer bröckeligen Masse, die mit 1 *l* Wasser übergossen und im Wasserbade gelöst wird. Zu der Lösung

fügt man 200 *g* Natriumazetat (D. A. B. V.) sowie wegen des noch vorhandenen Alkohols einige Siedesteinchen hinzu und stellt den Kolben mit einem Steigrohr versehen auf 4 Stunden in das lebhaft siedende Wasserbad. Nach Ablauf dieser Zeit filtriert man durch ein Faltenfilter im Heißwassertrichter wie oben in den Kochtopf hinein, kocht das Filter mit 300 cm^3 Wasser aus, dessen Filtrat mit der Hauptmenge vereinigt wird, verflüssigt den inzwischen erstarrten Inhalt des Kessels wieder und fällt mit 2·5 *l* warmem Alkohol. Die ersten Anteile muß man vorsichtig in kleinen Portionen zusetzen, der entstehende Niederschlag löst sich dann bis zu einem bestimmten Punkte immer wieder auf; erst wenn er Neigung hat, bestehen zu bleiben, fügt man den Rest schnell hinzu. Das nukleinsaure Natrium fällt teils flockig, teils als weiche Masse aus. Der Charakter der Fällung ist von mehreren Faktoren abhängig; je länger man das Präparat mit Natronlauge oder in wässeriger Lösung besonders mit Natriumazetat erhitzt hat, um so größer ist die Neigung, nicht flockig, sondern als teigige Masse, ja unter Umständen sogar schmierig (nach sehr langem Eindampfen) auszufallen. In Siedehitze niedergeschlagen, fällt das reine nukleinsaure Natrium immer sehr weich aus, im Gegensatze zu der ersten eiweißhaltigen Rohfällung, die am schönsten in Siedehitze zu erhalten ist. Überhaupt habe ich den bestimmten Eindruck, daß das Präparat um so schöner flockig ausfällt, je unreiner es noch ist; auch nach der ungekürzten *Neumann*schen Methode dargestellt, fällt die erste Rohfällung, wenn nicht allzu lange eingedampft worden war, fast stets schön flockig; die späteren Umfällungen sind dagegen stets teigig.

Die Weiterverarbeitung des Präparates geschieht nun derart, daß man die Masse nach halbstündigem Absitzen über einem Filter absaugt, auspreßt, den Rückstand in Streifen schneidet und diese in der gleichen Weise wie vorher in 1 *l* Wasser löst. Stellt man den Kolben jetzt auf etwa eine Viertelstunde in das siedende Wasserbad, so scheidet sich noch ein geringer flockiger Niederschlag ab, der im Heißwassertrichter filtriert wird. Das Filtrat wird mit 10 *g* Natriumazetat versetzt und in der gleichen Weise wieder mit 2 *l* Alkohol gefällt, die Fällung dieses Mal über einem gehärteten Filter abgesaugt, der Rückstand zerzupft und über Nacht unter absolutem Alkohol stehen gelassen. Man vermeide aber, das Präparat zu sehr zu drücken, sonst geht die vorhandene Porosität verloren, und der Körper wird im Alkohol nur langsam und unter Entstehung sehr harter Brocken entwässert. Am anderen Morgen gießt man den Alkohol ab und verreibt das Produkt unter Alkohol in der Reibschale; endlich wird der entstandene weiße Schlamm über einem gehärteten Filter abgesaugt, mit Äther nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure vollends getrocknet. Ausbeute zirka 100 *g*.

Das so dargestellte nukleinsaure Natrium ist biuretfrei, löst sich in Wasser klar und farblos auf und gibt das verlangte Verhältnis N : P = 1·70.

Zur weiteren Charakterisierung der a-Nukleinsäure empfehle ich den Schmelzpunkt einer gelatinierten 5%igen Lösung des Natriumsalzes. Dieser gibt uns nämlich Aufschluß über die Menge der nebenbei gebildeten b-Säure, deren Natriumsalz in 5%iger Lösung nicht gelatiniert und daher den Schmelzpunkt herabsetzt. Der Schmelzpunkt liegt demnach um so tiefer, je mehr von der b-Säure sich gebildet hat — also je länger das Präparat der Einwirkung der Natronlauge oder auch des Natriumazetats (letzteres viel milder wirkend) in Siedehitze ausgesetzt war. Die nach dem beschriebenen abgekürzten Verfahren hergestellten Präparate weisen, wegen des Fortfalles des Eindampfens, Schmelzpunkte auf, wie sie nach der alten Methode nicht erreicht werden konnten.

Der Schmelzpunkt einer 5%igen Gallerte lag bei den analysierten Präparaten bei 50° bezw. 54°. Die Gegenwart von Natriumazetat setzt die Schmelzpunkte erheblich herauf; so betrug der Schmelzpunkt von Präparat II

in Wasser (zu 5% gelöst)	54°
in 1%iger Natriumazetatlösung . . .	63°
in 10%iger „	71°.

d) D a r s t e l l u n g d e s b-n u k l e i n s a u r e n N a t r i u m s n a c h *Feulgen*[1]).

a-nukleinsaures Natrium wird in offener Schale erst mehrere Stunden bei etwa 60°, dann 24 Stunden bei 100° getrocknet und endlich 4 Tage auf 110° im Toluolschrank erhitzt. Das ganz schwach gelblich gefärbte Präparat wird zu 5% in Wasser gelöst und unter Anwendung von etwas Natriumazetat mit dem doppelten Volumen Alkohol wieder ausgefällt und unter Alkohol entwässert.

e) R e i n d a r s t e l l u n g d e r f r e i e n b-N u k l e i n s ä u r e nach *Feulgen*[1]).

Zur Reindarstellung der b-Nukleinsäure eignet sich vorzüglich die Fällung mit Krystallviolett, weil das gebildete nukleinsaure Kristallviolett in Methylalkohol löslich ist und eine erhebliche Menge von Verunreinigungen ungelöst zurückbleiben[2]). Aus der methylalkoholischen Lösung kann dann die freie b-Nukleinsäure leicht und schonend mittels Salzsäure ausgefällt werden, während das Chlorid der Farbbase (Kristallviolett) in alkoholischer Lösung bleibt. Ich empfehle folgende Arbeitsweise:

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 165 (1914).

[2]) *Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**. 326 (1913).

a-nukleinsaures Natrium wird, wie oben beschrieben, getrocknet und durch Erhitzen auf 110⁰ in das Natriumsalz der b-Säure übergeführt. Zur Darstellung des Farbsalzes kommt die doppelte Menge Kristallviolett in Anwendung. Das nukleinsaure Natrium wird zuerst in 5%ige wässerige Lösung gebracht (wobei konstatiert wird, daß die Flüssigkeit auch bei 0⁰ nicht gelatiniert) und mit dem doppelten Volumen Alkohol unter Anwendung von etwas Natriumazetat gefällt. Die Fällung nimmt man in einem Kolben vor; wird dieser kräftig geschüttelt, so legt sich der ausgefallene Körper als teigige Masse an die Gefäßwand an. Man läßt einige Stunden absitzen, gießt die Mutterlauge ab, läßt gut abtropfen und löst den Niederschlag zu einer etwa 1%igen Lösung auf. Die doppelte Menge Kristallviolett wird zunächst auf dem siedenden Wasserbade zu einer etwa 10%igen Lösung aufgelöst und die Flüssigkeit dann in die neunfache Menge Wasser gegossen, so daß auch hier eine 1%ige Lösung entsteht. Die Fällung geschieht nun derart, daß man die Lösung des nukleinsauren Natriums in sehr dünnem Strahle mittels Tropftrichters in die Farblösung hineinfließen läßt. Man läßt bis zum nächsten Tage stehen; die Mutterlauge wird dann vorsichtig dekantiert und der Niederschlag auf einem sehr geräumigen Faltenfilter mit viel Wasser ausgewaschen. Endlich durchstößt man das Filter, spritzt den Niederschlag in ein Becherglas, saugt über einem gehärteten Filter an der Pumpe ab und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur.

Das vollkommen trockene Farbsalz wird jetzt unter Erwärmen zu 5% in Methylalkohol gelöst, von ungelösten Verunreinigungen abzentrifugiert und aus der methylalkoholischen Lösung die freie b-Nukleinsäure mit Salzsäure gefällt. Man wende so viel doppelt Normalsalzsäure an, als man Farbnukleinat in Lösung gebracht hat.

Die ausgefallene freie Nukleinsäure wird auf einem Faltenfilter abfiltriert, mit schwach essigsaurem Alkohol ausgewaschen und mit Alkohol in einen Kolben hineingespritzt. Dieser wird jetzt unter heftigem Umschwenken über freier Flamme vorsichtig erwärmt, wodurch eine festere Koagulation der Nukleinsäure hervorgerufen wird, so daß das Präparat an der Saugpumpe besser filtriert. Man saugt jetzt über einem gehärteten Filter ab, wäscht gut mit Alkohol und dann mit Äther nach und trocknet vollends im Exsikkator über Schwefelsäure unter vermindertem Druck. Das Trocknen muß sehr sorgfältig geschehen, da sich die freie Nukleinsäure sonst zersetzt. Am besten wird sie noch mehrere Tage über Natronkalk im Exsikkator aufgehoben, um mit Sicherheit alle flüchtige Säure zu entfernen. Das so dargestellte Präparat ist infolge seiner Herkunft und infolge der intensiven Färbekraft des Kristallvioletts noch blau gefärbt, was für die Analyse aber ohne Belang ist. Vollkommen farblos erhält man es, wenn man aus der freien Säure durch Auf-

lösen in verdünnter Natronlauge das Natriumsalz bildet und dieses einigemal aus Wasser mit Alkohol umfällt.

Das Filtrieren kann warm oder kalt vorgenommen werden. Aus dem wasserklaren Filtrat wird das nukleinsaure Natrium durch Alkohol ausgefällt und durch Lösen in Wasser und Umfällen vom Kochsalz befreit. Doch ist das nicht leicht zu erreichen. Deshalb ist es zweckmäßig, das Kochsalz durch Dialyse zu entfernen und dann mit Alkohol zu fällen. Eine in der Wärme dargestellte, konzentrierte Lösung dieses Präparates gelatiniert aber beim Erkalten, weil es noch einen Rest der a-Nukleinsäure enthält. Dieser nicht aufgeschlossene Anteil läßt sich durch fraktionierte Fällung mit Alkohol leicht entfernen, indem er nach Zusatz von ein wenig Alkohol zu der wässerigen Lösung zuerst gefällt wird. Der in Lösung bleibende, aufgeschlossene, nicht gelatinierende Anteil wird dann nach dem Absetzen der ersteren aus der abgegossenen Flüssigkeit durch einen weiteren Zusatz von Alkohol ausgefällt und erst durch Dekantieren und schließlich auf dem Filter mit Alkohol ausgewaschen.

f) Darstellung von Nukleinsäure nach *Peters*[1]).

Das Gewebe, das als Ausgangsmaterial dient, wird mit der Fleischhackmaschine zerkleinert und der entstehende Brei im Verhältnis 1:2 mit halbgesättigter Kochsalzlösung vermischt; man erhitzt, fügt langsam so viel pulverisiertes Bariumhydroxyd hinzu, daß die Reaktion gegen Lakmus deutlich alkalisch wird, erhitzt nach der Zugabe von Wasser noch eine halbe Stunde und saugt an der Nutsche ab. Das erkaltete Filtrat wird mit 20% Salzsäure angesäuert, unter Zusatz von etwas Äther gründlich durchgerührt, filtriert. Der Niederschlag wird mit dem Filter in einer Porzellanschale mit einem Gemisch von gesättigter Kochsalzlösung und $^1/_1$ n Natronlauge erhitzt, erkalten lassen und mit 96% Alkohol versetzt. Nach kurzem Stehen wird filtriert, das klare Filtrat in einen Scheidetrichter gebracht und mit gesättigter Kochsalzlösung und Äther versetzt. Nach dem Ansäuern mit 20% Salzsäure schüttelt man, gießt die wässerige Schicht fort, bringt das zurückbleibende Gemisch von Äther und Nukleinsäure mit Hilfe von 60% Alkohol in ein konisches Glasgefäß, filtriert, wäscht die auf dem Filter bleibende Nukleinsäure mit 60% Alkohol, absolutem Alkohol und dann mit Äther aus und trocknet sie in einem Exsikkator.

2. Eigenschaften der Nukleinsäure aus Thymus.

Die auf die eine oder andere Weise gewonnenen Nukleinsäuren sind weiße, pulverförmige, amorphe Substanzen, in kaltem Wasser schwer löslich, in Alkohol und Äther unlöslich. Sie existieren in

[1]) *Peters:* Journ. of biol. chem. **10**. 373 (1911/12).

zwei verschiedenen Modifikationen, a- und b-Säure bezw. α- und β- Säure, von denen die a-Form schwerer in Wasser löslich ist wie b. In heißem Wasser lösen sie sich unter Zersetzung auf. Ihre Alkalisalze sind in Wasser leicht löslich, eine mindestens 5%ige Lösung des a-nukleinsauren Natrons erstarrt in der Kälte zu einer klaren festen, durchsichtigen Gelatine. Die Säuren sind gleichfalls in Ammoniak, Alkalikarbonaten und -azetaten leicht löslich und werden durch Essigsäure nicht aus ihren Lösungen gefällt, dagegen durch Mineralsäuren. Mit Schwermetallen geben sie in Wasser unlösliche Salze, desgleichen mit Erdalkalien schwer lösliche basische Salze. Als Zeichen, daß sie eiweißfrei sind, dürfen sie keine Biuretreaktion geben, ein anderes Zeichen ihrer Reinheit ist, daß eine Lösung von reinem nukleinsauren Natron mit Alkohol allein keinen Niederschlag gibt, sondern erst auf Zusatz einiger Tropfen konzentrierter wässeriger Natriumazetatlösung. Mit Gerbsäure, Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure geben sie keine Fällung, dagegen tritt nach *Araki* mit Gerbsäure ein Niederschlag bei Gegenwart von Natriumazetat ein[1]).

Die nukleinsauren Salze, z. B. das Cu-Salz, lassen sich bei 90 bis 95⁰ bis zur Gewichtskonstanz ohne Zersetzung trocknen; bei höherer Temperatur tritt weitere Gewichtsabnahme ein, dann färben sich die Präparate aber braun, ein Zeichen beginnender Zersetzung.

Sorgfältig mit Alkohol und Äther getrocknete Nukleinsäure hält eine konstante Menge Wasser zurück. Das Na-Salz entspricht lufttrocken der Formel $C_{43} H_{57} Na_4 N_{15} O_{34} P_4 + 9 H_2 O$, der freien Säure kommt also die Formel $C_{43} H_{61} N_{15} P_4 O_{34} + 9 H_2 O$ zu[2]). Die Verbindungen der Nukleinsäure mit Farbbasen entsprechen auch einer vierbasischen Säure[3]).

Die echte Nukleinsäure ist optisch-aktiv, sie dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, die Drehung ist abhängig von der Konzentration und der Azidität bezw. Alkaleszenz der Lösung[4]).

In essigsaurer Lösung gibt die Nukleinsäure mit Eiweiß einen Niederschlag (sogenanntes künstliches Nuklein), der in Salzsäure schwer löslich ist.

Sie reduziert nicht *Fehling*sche Lösung, auch nicht nach dem Kochen mit Mineralsäuren, wohl aber erhält man eine der Pentosenreaktion ähnliche Färbung, wenn man Nukleinsäure mit Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·19) zum Sieden erhitzt, Phloroglukin hinzufügt, durchschüttelt und sofort abkühlt. Die Flüssigkeit färbt sich

---

1) *Araki*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 93. Anm. (1900).
2) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**. 497 (1912).
3) *R. Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 73 (1912).
4) *Jones*: Journ. f. biol. Chem. **5**. 11 (1904).

kirschrot, doch läßt sich im Gegensatz zur Pentosenreaktion der Farbstoff nicht mit Amylalkohol der Flüssigkeit entziehen[1]).

Die echte Nukleinsäure ist eine vierfache Phosphorsäure, die, ähnlich der Glyzerinphosphorsäure, 4 Kohlenhydratgruppen enthält, an die dann je 1 Mol. Guanin, Adenin, Thymin und Zytosin gebunden sind.

3. Nachweis der Thymusnukleinsäure.

Der Nachweis der Thymusnukleinsäure kann durch den Nachweis der Spaltungsprodukte erfolgen (Phosphorsäure, Alloxurbasen, Pyrimidinkörper, *Neumann*sche Pentosenreaktion). Oft wird man mit Vorteil das Verhältnis N: P benützen können in Niederschlägen, deren Nukleinsäurenatur feststeht (N: P = 1·70).

Mikroskopisch läßt sich Thymusnukleinsäure nachweisen[2]), wenn man zu einem Körnchen Substanz einen Tropfen starker Salpeter- oder Salzsäure auf dem Objektträger unter dem Deckgläschen zufließen läßt; nach wenigen Augenblicken beginnt reiche Abscheidung von doppeltbrechenden Kristallen (Guanin- bezw. Adeninnitrat oder -chlorid).

Quantitative Bestimmung der Nukleinsäure[3]).

Die Methode von *Neumann* läßt sich für quantitative Bestimmungen gebrauchen. Zum Beispiel wurden aus 23 *g* lufttrockenen Köpfen von Heringsspermatozoen 11·92 *g* Nukleinsäure gewonnen, d. h. 91% der aus dem P-Gehalt der Köpfe und aus meiner Nukleinsäureformel $C_{43} H_{57} O_{30} N_{15} P_4$ berechneten Menge. In das Filtrat von der Nukleinsäurefällung waren nur ganz geringe Mengen Phosphor hineingegangen, die 0·49 *g* Nukleinsäure entsprechen würden.

B. Methoden zur Darstellung der Thyminsäure.

Trennt man aus der Nukleinsäure die Alloxurbasen ab, so hinterbleibt eine Säure, die noch sämtlichen Phosphor in organischer Bindung enthält, sie ist wohl identisch mit der Thyminsäure; offenbar ist sie auch der Nukleotinphosphorsäure von *Schmiedeberg* sehr ähnlich.

$$\underset{\text{Thymonuklainsäure}}{C_{48} H_{57} O_{30} N_{15} P_4} + 2 H_2 O = \underset{\text{Guanin}}{C_5 H_5 ON_5} + \underset{\text{Adenin}}{C_5 H_5 N_5} + \underset{\text{Thyminsäure}}{C_{33} H_{51} O_{31} N_5 P_4}$$

[1]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **56.** 215 (1908).
[2]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **48.** 427 (1906).
[3]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **72.** 305 (1911).

1. Darstellung der Thyminsäure nach Kossel und Neumann[1]).

Man erwärmt auf einem Wasserbade 500 cm^3 Wasser in einem Becherglase. Wenn die Wasserbadtemperatur erreicht ist, so gibt man 10 *g* Nukleinsäure in der Weise hinzu, daß nichts an den Wandungen des Gefäßes hängen bleibt, erhitzt etwa 10 Minuten unter Umrühren weiterhin auf dem Wasserbade und gießt die trübe Flüssigkeit durch ein Faltenfilter. Man prüft nun das Filtrat, indem man eine Probe desselben im Reagenzglas mit einem Tropfen Salzsäure versetzt. Es darf kein Niederschlag von Nukleinsäure entstehen, sonst hat man zu kurze Zeit erhitzt und muß die Flüssigkeit für einige Minuten aufs Wasserbad zurückbringen. Darauf fügt man zu der Probe Barytwasser im Überschuß, es darf sich kein Baryumphosphat abscheiden, sonst hat man zu lange erhitzt und ein Teil der Thyminsäure ist unter Abspaltung von Phosphorsäure weiter zerlegt worden. Man setzt zu dem Filtrat kalt gesättigtes Barytwasser bis zur bleibend schwach alkalischen Reaktion hinzu und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Die Flüssigkeit trübt sich langsam und scheidet sämtliches Guanin (vermischt mit Bariumkarbonat) ab. Die vom Guanin abfiltrierte Lösung wird in die 1½fache Menge Alkohol hineingegossen. Entsteht kein Niederschlag, sondern nur eine milchige Trübung, so fügt man einige Tropfen einer wässerigen Lösung von Chlorbarium hinzu. Man läßt bis zum nächsten Tage stehen, damit das durch das Erhitzen auf dem Wasserbade abgespaltene Adenin und Zytosin vollständig in den Alkohol hineingehen. Der thyminsaure Baryt hat sich in etwas klebrigen Massen am Boden des Gefäßes abgeschieden. Er wird im Gefäß mit Alkohol ausgewaschen und sodann in etwa 200 cm^3 Wasser gelöst. Diese Lösung gießt man in die dreifache Menge Alkohol und fügt nötigenfalls etwas Chlorbarium hinzu, um eine vollständige Abscheidung des Niederschlages zu bewirken. Man wiederholt dies Umlösen so lange, bis man eine rein weiße, pulverige Fällung erhält.

2. Darstellung der Thyminsäure nach Steudel und Brigl[2]).

Lufttrockenes nukleinsaures Natron wurde in Portionen von je 10 *g* mit einem erkalteten Gemisch von 10 cm^3 Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·4 und 10 cm^3 Wasser unter Kühlung übergossen und unter häufigem Durchrühren 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die Zersetzung der Nukleinsäure noch nicht ganz vollendet. Die Menge des größtenteils kristallinischen Niederschlages beträgt dann 3·2 *g* statt der theoretisch für die Nitrate der Purinbasen berechneten 2·9 *g*, da in ihm

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 74 (1896/97).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 398 (1910).



noch phosphorhaltige Körper vorhanden sind, hauptsächlich wohl die in verdünnten Säuren schwer lösliche, noch nicht angegriffene Nukleinsäure. Der Versuch muß jedoch nach 2 Tagen unterbrochen werden, da sonst weitgehende Hydrolyse eintritt. Dasselbe ist der Fall, wenn man die Temperatur während des Versuches zu hoch steigen läßt. Hat man jedoch obige Bedingungen eingehalten, so enthält die von den Purinbasen abfiltrierte Flüssigkeit nur wenig anorganische Phosphorsäure. Sie wird auf etwa 100 cm^3 verdünnt, mit Sodalösung neutralisiert und mit basischem Bleiazetat gefällt. Es entsteht ein voluminöser weißer Niederschlag, der abzentrifugiert und mehrere Male mit Wasser ausgewaschen wird. Dann wird der Bleiniederschlag in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Zuletzt wird, um besser filtrieren zu können, rasch zum Sieden erhitzt und vom Schwefelblei getrennt.

Das schwach gelbliche Filtrat zeigt nach Entfernung des Schwefelwasserstoffes schwache Reduktionswirkung gegen *Fehling*-sche Lösung, die jedoch im Laufe der weiteren Verarbeitung wieder verschwindet. Es dreht das polarisierte Licht nach rechts. Jetzt wird mit Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, es fällt in geringer Menge ein Niederschlag, der hauptsächlich aus Phosphat besteht. Auf Zusatz des gleichen Volumens Alkohol fällt dann das Barytsalz der gesuchten Säure als weißer Niederschlag, der sich beim Trocknen etwas gelbich färbt. Aus 50 *g* des nukleinsauren Natriums erhält man so etwa 20 *g* des Salzes. Obwohl nur durch Alkoholzusatz ausfällbar, geht der Körper, einmal ausgefällt, rasch in eine in Wasser unlösliche Form über. Schüttelt man ihn direkt nach dem Ausfällen mit Wasser, so geht nur noch ein kleiner Teil in Lösung, der auch mit der Zeit rascher beim Erhitzen in die unlösliche Form übergeht.

3. Darstellung der Thyminsäure nach Feulgen[1]).

Gang der Darstellung:

Aus einer Lösung von nukleinsaurem Natrium wird durch einen kleinen Überschuß von Schwefelsäure die Nukleinsäure freigemacht und die Hydrolyse bei 80° in 40 Minuten zu Ende geführt. Die Purinbasen werden gegen Schluß durch Hinzufügen von festem Silbersulfat beseitigt. Aus dem Filtrate wird das Silber mit Bariumchlorid und die Schwefelsäure mit Bariumazetat entfernt. Aus letzterem bildet sich das Bariumsalz der Thyminsäure, weil diese eine stärkere Säure als Essigsäure ist. Barytwasser ist wegen der großen Empfindlichkeit des Kohlenhydrates gegen Alkalien nicht geeignet. Das Filtrat wird mit Alkohol gefällt. Da das Natriumsalz der Thyminsäure mit Alkohol nicht fällbar ist, so bildet sich

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**. 296 (1918).

auch in Gegenwart von Natriumsalzen stets das Bariumsalz; es ist also nicht nötig, von freier Nukleinsäure auszugehen, im Gegenteil ist ihre Anwendung schon wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit nicht zu empfehlen.

Darstellung:

In einem Literkolben fügt man zu 600 *cm*³ luftfreiem Wasser unter gutem Umschütteln 20 *g* absolutes (von lufttrockenem entsprechend mehr) a-nukleinsaures Natrium so, daß nichts am Halse hängen bleibt und löst es auf dem Wasserbade. Dann bringt man die Temperatur der Lösung auf 80°, fügt 50 *cm*³ 2-n-Schwefelsäure von 80° hinzu und versenkt den Kolben nach Umschwenken sofort in ein vorbereitetes Wasserbad von 80°. Man läßt die ersten 10 Minuten ruhig im Wasserbade stehen, schüttelt aber dann einige Male um, wobei im Laufe einer Viertelstunde völlige Lösung entritt. Nach Ablauf von einer halben Stunde, vom Einbringen der Schwefelsäure an gerechnet, fügt man 7 *g* sehr fein pulverisiertes Silbersulfat hinzu und schüttelt während der nächsten 10 Minuten etwa alle Minuten kräftig um. Nach diesen 10 Minuten ist die Fällung der Purine beendet, was man daran erkennt, daß der Niederschlag sich rasch absetzt, und eine klare Flüssigkeit darüber steht. Innerhalb von 40 Minuten muß also der Prozeß beendet sein. Die Flüssigkeit wird dann sofort unter der Wasserleitung abgekühlt und dann noch unter Umschütteln eine Viertelstunde in Eiswasser gekühlt, um die Silberpurine sowie auch den größten Teil des in der Wärme gelösten Silbersulfats vollends abzuscheiden. Man saugt jetzt über einem gehärteten Filter ab und wäscht die Silberpurine mit etwa 20 *cm*³ Wasser nach. Die Filtration verläuft sehr rasch.

In den vereinigten Filtraten kann man nun folgende Reaktionen vornehmen: Auf Zusatz von etwas kalt gesättigter Silbersulfatlösung darf kein Niederschlag auftreten, dies würde freie, aber noch nicht niedergeschlagene Purine anzeigen. Wird die Probe dann auf 5 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, so darf weder beim Erhitzen noch auch beim Abkühlen ein Niederschlag oder nennenswerte Trübung auftreten, dies würde nämlich beweisen, daß zwar alle f r e i e n Purine ausgefällt, daß aber noch nicht alle Purine a b g e s p a l t e n waren.

Zur weiteren Verarbeitung wird die schwefelsaure Flüssigkeit in einem Literkolben mit einer heißen Lösung von 5 *g* Bariumchlorid und 35 *g* Bariumazetat in 60 *cm*³ Wasser versetzt, zur besseren Abscheidung des Bariumsulfates im Wasserbade von 80° auf etwa 60° erwärmt, dann wieder abgekühlt, und der Kolben zum Absetzen des Bariumsulfates in möglicht schräger Lage auf einen Strohkranz gesetzt. Nach 1 bis 2 Stunden saugt man die Flüssigkeit ab, und zwar zweckmäßig durch ein Talkumfilter, das

hergerichtet wird, indem man einen kleinen Teelöffel Talkum in etwas Wasser aufschwemmt und die Masse unter Saugen mit der Pumpe auf ein angefeuchtetes Filter im *Büchner*schen Trichter bringt. Man wäscht mit etwas verdünnter Essigsäure das Filter aus und gießt unter vorsichtigem Abgießen erst die Flüssigkeit, dann den Niederschlag auf das gedichtete Filter darauf. Auf diese Weise wird erreicht, daß schon die ersten Anteile des Filtrates völlig klar durchfließen und daß die Filtration an sich verhältnismäßig schnell verläuft. Wenn alles abgesaugt ist, aber noch bevor der Niederschlag rissig wird, gießt man etwa 20 cm^3 Wasser ohne Nachhilfe des Spatels nach und fällt nunmehr das Filtrat mit dem dreifachen Volumen Alkohol.

Man läßt den sich bildenden weißen, großflockigen Niederschlag sich absetzen, was in etwa einer Viertelstunde erreicht sein wird, härtet ihn zunächst durch öfteres Dekantieren mit 96%igem Alkohol und saugt schließlich unter Zuhilfenahme von Alkohol und eventuell Äther ab. Es ist zu beachten, daß vor gehörigem Entwässern der Niederschlag nicht abgesaugt werden darf, da er sonst sehr leicht klebt. Ausbeute zirka 60% der Theorie.

Manchmal fällt das thyminsaure Barium bei der Alkoholfällung nicht flockig, sondern klumpig aus; in einem solchen Falle ist vor dem Absaugen für gute Entwässerung durch wiederholtes Verreiben mit Alkohol Sorge zu tragen.

Das an der Saugpumpe mit 96%igem Alkohol nachgewaschene Präparat wird über Nacht im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet und stellt dann ein blendend weißes, schönes lockeres Pulver von sehr gleichmäßigem Korn dar. Es ist für die meisten Zwecke rein genug; vieles Umfällen ist völlig zwecklos, eine Verbesserung wird dadurch nicht erzielt, höchstens kann man es durch Umfällen vor der Analyse etwas besser von den in erheblicher Menge mitgerissenen Bariumsalzen (besonders $BaCl_2$) trennen; doch hat andererseits das thyminsaure Barium zum schönen Ausflocken mit Alkohol immer etwas Bariumsalz nötig, weshalb man auch immer etwa um 2% zu hohe Werte für das Barium und etwa 0·5% zu wenig C erhält. Analysiert wurde das thyminsaure Barium lufttrocken, während in einer besonderen Probe der Wassergehalt bei 60° über Phosphorpentoxyd bestimmt wurde. Es darf nur wenige Stunden in dieser Weise getrocknet werden, da es sich bald unter Zersetzung gelb färbt.

4. Eigenschaften und Nachweis der Thyminsäure.

Das thyminsaure Barium stellt ein schneeweißes, lockeres Pulver dar, das sich in Wasser äußerst leicht und willig, fast augenblicklich löst. Auch ist es noch ziemlich löslich in 50%iger Essig-

säure, unlöslich dagegen in allen anderen Lösungsmitteln. Die leichte Löslichkeit ist gewissermaßen ein Kennzeichen für die Unversehrtheit des Körpers; denn schwer- oder unlösliche Präparate können als zersetzt angesehen werden. Sie lösen sich dann noch auf Zusatz von Essigsäure oder in hartnäckigen Fällen in salzsaurer Reaktion. Längere Zeit trocken aufbewahrt oder kurze Zeit erwärmt (auch in wässeriger Lösung), wird es ebenfalls unlöslich, in alkalischer Lösung auch bald bei gewöhnlicher Temperatur. Das Natriumsalz dagegen bleibt immer löslich, auch bei alkalischer Reaktion. Die Salze der Thyminsäure wirken als kräftige Schutzkolloide, besonders das thyminsaure Natrium. Versetzt man zu dem Behufe, das Bariumsalz in das Natriumsalz zu verwandeln, eine Lösung von thyminsaurem Barium mit Natriumsulfatlösung, so entsteht eine vollkommen kolloidale Lösung von Bariumsulfat. Beim Erhitzen wird dieses zwar ausgeflockt, reißt aber dann einen großen Teil von noch nicht zersetztem Bariumsalz mit. Das kolloidale Bariumsulfat ist nicht sehr beständig, schon verdünnte Essigsäure bringt es zur Abscheidung. Viel beständiger sind kolloidale Silberlösungen; sie werden leicht erhalten, wenn man thyminsaure Salzlösung mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Wegen der Empfindlichkeit des Kohlenhydrates gegen Natronlauge darf die Silberlösung nur aus Silberoxyd und Ammoniak bereitet werden. Außerdem wendet man zu diesem Zwecke besser das Natriumsalz der Thyminsäure an, weil das Bariumsalz in ammoniakalischer Lösung bei längerer Dauer des Versuches unlöslich wird. Nach Zusammenbringen der beiden Lösungen tritt schon nach wenigen Augenblicken Braunfärbung ein und in wenigen Minuten ist eine tief braunschwarze, völlig lackfarbene Lösung von kolloidalem Silber entstanden. Durch Mineralsäure kann das reduzierte Silber wieder ausgeflockt werden.

Am beständigsten sind kolloidale Palladiumlösungen, die bereitet werden, indem man eine Lösung von thyminsaurem Natrium mit Palladiumchlorür versetzt und mit Wasserstoff schüttelt. Dieses Kolloid ist so beständig, daß sehr große Mengen Salzsäure notwendig sind, um das Palladium auszuflocken.

Das thyminsaure Barium ist wenig beständig; beim Aufbewahren nimmt es schon nach einigen Tagen eine gelbliche Farbe an; eine wässerige Lösung färbt sich schon über Nacht. Die Thyminsäure muß deswegen immer frisch bereitet werden. Die Empfindlichkeit beruht auf der leichten Verharzbarkeit des Kohlenhydrates; Laugen und Säuren werden also die Zersetzung wesentlich beschleunigen. In der Tat geben Lösungen von thyminsaurem Natrium schon mit wenigen Prozenten freien Alkalis in kurzer Zeit Braunfärbung schon in der Kälte.

Mineralsäuren bewirken ebenfalls fast augenblicklich Rotfärbung. Ja, die freie Thyminsäure ist „gegen sich selbst" so empfindlich, daß wässerige Lösungen von thyminsaurem Barium sofort rot werden, wenn man nur so viel Salzsäure zusetzt, daß nur Thyminsäure, nicht aber Salzsäure in freiem Zustande erscheint. Diese Verharzung durch die eigene Azidität tritt selbst in sehr verdünnten Lösungen ein. Eigentümlich ist es, daß während der Darstellung der Thyminsäure durch Hydrolyse der Nukleinsäure mit verdünnter Schwefelsäure die frisch entstandene Thyminsäure keineswegs sich derart empfindlich gegen Säuren erweist; gelingt es doch, nach der beschriebenen Methode völlig farblose Präparate zu erhalten. Die Empfindlichkeit gegen Säuren steigert sich also dadurch, daß das thyminsaure Barium isoliert und dabei im trockenen Zustande mit der Luft in Berührung kommt; denn es ist kaum anzunehmen, daß die bei der Hydrolyse entstehenden Nebenprodukte — Guanin- und Adeninsulfat — konservierend auf die Thyminsäure einwirken.

Von konservierendem Einflusse aber sind die Salze der schwefeligen Säure. Thyminsaures Natrium, in Lösung mit etwas neutralem Natriumsulfit versetzt, bleibt selbst in Gegenwart von Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur verhältnismäßig ungefärbt, doch erstreckt sich dieser Schutz nicht so weit, daß es gelingen könnte, durch alkalische oder saure Hydrolyse das Kohlenhydrat abzuspalten und zu isolieren.

Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß die freie Thyminsäure in trockenem Zustande überhaupt nicht unzersetzt darstellbar ist, bereitet doch schon die Darstellung anderer Salze erhebliche Schwierigkeiten dadurch, daß während der Manipulationen in wässeriger Lösung leicht eine Verharzung eintreten kann, besonders dann, wenn man es unternehmen würde, über die freie Säure die anderen Salze darzustellen. Dies ist nicht gut möglich; man muß schon zur doppelten Umsetzung seine Zuflucht nehmen, muß sich aber dann natürlich gewisse Beschränkungen auferlegen.

Manche Salze mit organischen Basen sind in Alkohol löslich und mit Äther wieder fällbar, so z. B. das Salz der Kristallviolettbase, das, weil in Wasser unlöslich, leicht durch doppelte Umsetzung des thyminsauren Bariums mit käuflichem Kristallviolett gewonnen werden kann. Aus der alkoholischen Lösung kann man durch Zusatz von Bariumazetatlösung das Bariumsalz der Thyminsäure wieder durch doppelte Umsetzung zurückgewinnen.

Das Kalziumsalz verhält sich ähnlich wie das Bariumsalz. Bleisalze sind in neutraler und alkalischer Lösung unlöslich, in verdünnter Essigsäure hingegen leicht löslich; sie lassen sich aus essigsaurer Lösung auch ganz gut mit Alkohol niederschlagen.

Alkohol ist nur für Barium-, Kalzium- oder Bleisalze ein gutes Fällungsmittel, für das Natriumsalz hingegen nicht, obwohl es in Alkohol unlöslich ist. Setzt man aber bei einem solchen Versuche irgend ein lösliches Bariumsalz hinzu, so erfolgt sofort Fällung unter Bildung des Bariumsalzes durch doppelte Umsetzung.

Thyminsäure ist in schwefelsaurer Lösung nicht fällbar mit Phosphorwolframsäure, wohl aber mit *Hopkins* Reagens; die Fällung ist aber sehr unvollkommen und eignet sich nicht zur Isolierung der Thyminsäure. Auch Bleiessig und Bleizucker in neutraler bezw. schwach ammoniakalischer Lösung sind Fällungsmittel. Die Bleifällungen sind in verdünnter Essigsäure leicht löslich.

Selbstverständlich gibt das thyminsaure Barium alle Reaktionen, die der Gruppe des Glukals eigentümlich sind. Zweckmäßig nimmt man dazu 10%ige Lösungen. Die Aldehydreaktion mit fuchsinschwefeliger Säure ist jedoch so empfindlich, daß ein einziger Tropfen einer nur 1%igen Lösung genügt, um mehrere Kubikzentimeter fuchsinschwefelige Säure zu färben. Eine höhere Konzentration ist bei dieser Reaktion schon aus dem Grunde zu vermeiden, weil konzentrierte Bariumsalzlösungen wegen ihrer SO_2 fällenden Wirkung auch allein eine schwache Färbung der fuchsinschwefeligen Säure hervorrufen können.

C. Darstellung der Nukleothyminsäure nach Neumann[1]).

Zur Darstellung der Nukleothyminsäure wird freie Nukleinsäure unter heftigem Rühren in der 20fachen Menge Wasser von 60° so schnell wie möglich gelöst, die Lösung filtriert und nach völligem Erkalten in die dreifache Menge Alkohol gegossen, dem man pro Liter etwa 15 cm^3 konzentrierte Salzsäure hinzugefügt hat. Man erhält einen weißen Niederschlag, welcher säurefrei gewaschen, in kaltem Wasser gelöst und wieder durch alkoholische Salzsäure gefällt wird. Die Nukleothyminsäure ist in Wasser ziemlich leicht löslich, enthält aber noch Alloxurbasen in ihrem Molekül zum Unterschied von der Thyminsäure.

D. Darstellung der Nukleinsäure aus Hefe.

a) Nach *R. Altmann*[2]).

2 *l* frischer Brauereihefe werden mit 6 *l* Wasser vermischt, eine Lösung von 200 *g* Natron in 500 cm^3 Wasser zugefügt und 5 Minuten kräftig gerührt. Darauf wird der größte Teil des Natrons mit verdünnter Salzsäure abgestumpft, so daß noch starke alkalische Reaktion übrig bleibt und die Masse ihr Aussehen nicht wesentlich

[1]) Arch. f. (Anat. und) Physiol. Supplementband 1899, 552.

[2]) *Altmann*: Arch. f. (Anat. und) Physiol. 1889, 525.

geändert hat; dann wird mit Essigsäure übersäuert und 24 Stunden absitzen gelassen. Es wird dekantiert, der Rest filtriert und Salzsäure vorsichtig bis zur bleibenden Trübung hinzugesetzt. (Die ersten Niederschläge lösen sich beim Umrühren wieder auf.) Man braucht hierzu so viel Salzsäure, daß alles Natron, auch das an Essigsäure gebundene, gesättigt ist. Dann wird noch so viel Salzsäure hinzugefügt, daß der Gesamtgehalt an freier H Cl etwa 3 bis 5‰ beträgt und das Ganze mit einem gleichen Volumen Alkohol vom gleichen Säuregehalt vermischt. Man läßt einen oder mehr Tage stehen, gießt die Flüssigkeit ab und bringt den Niederschlag aufs Filter. Hier wird er mit nicht zu wenig 50% Alkohol von 3‰ H Cl verrieben, filtriert und dasselbe mit reinem Alkohol aus Äther wiederholt. Das erhaltene Pulver ist rohe Nukleinsäure.

Gereinigt wird sie folgendermaßen: 35 *g* rohe trockene Nukleinsäure wird mit Hilfe von wenig Ammoniak in 1 *l* Wasser gelöst, mit Essigsäure übersäuert, zentrifugiert, die trübe Flüssigkeit mit H Cl und Alkohol in oben beschriebener Weise gefällt, der Niederschlag auf einem Filter gesammelt, noch feucht mit wenig Ammoniak wieder in 500 cm^3 Wasser gelöst, mit Essigsäure schwach übersäuert und ein gleiches Volumen Alkohol hinzugefügt. Der Niederschlag wird von der wasserklaren Flüssigkeit getrennt und das Filtrat bis zu 3 bis 5‰ mit H Cl versetzt. Der nun entstehende Niederschlag wird gesammelt, nacheinander mit 50% Alkohol (H Cl 3‰), Alkohol absolutus und Äther verrieben, filtriert, getrocknet und gepulvert.

b) Darstellung der Hefenukleinsäure nach *Slade*[1]).

Frische Brauereihefe wird mit 1·1% ihres Gewichtes an Ätznatron lebhaft verrührt, in wenig Wasser gelöst und das zwei- bis dreifache an kristallisiertem Natriumazetat in Substanz zugesetzt. Gewöhnlich kommen auf 100 Pfund Hefe 2·8 Pfund Natriumazetat. Die Lösung bleibt 24 Stunden stehen bei gewöhnlicher Temperatur und wird dann eine Stunde lang gekocht. Die heiße Lösung wird mit Eisessig bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert und zum erkalteten Filtrat wird Magnesiumsulfat in Substanz (5% der Lösung) und dann Salzsäure unter Umrühren hinzugesetzt, bis ein flockiger Niederschlag entsteht. Der Niederschlag ist im Überschuß der Säure zu einer milchigen Flüssigkeit löslich. Ist dies der Fall, so muß mit Natronlauge wieder neutralisiert und noch einmal gefällt werden. 2·5% starker Salzsäure in der Flüssigkeit genügen im allgemeinen zur vollkommenen Ausfällung. Ausbepte 0·5% der in Angriff genommenen Hefe. Phosphorgehalt des Produktes etwa 7%.

---

[1]) Amer. Journ. of Physiol. **13**. 464.

c) **Reindarstellung der Hefenukleinsäure nach *Levene*[1]).**

Käufliche Substanz wird in möglichst wenig heißem Wasser aufgelöst, die Lösung an der Saugpumpe abfiltriert und das Filtrat mit einem großen Überschuß von Eisessig ausgefällt. Die Fällung wird über Seide abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die auf diese Weise dargestellte Substanz eignet sich gut zur Gewinnung der Pentoside.

Die Methode von *Neumann* eignet sich nicht für die Darstellung der Hefenukleinsäure, da bei ihr das Hefegummi mitgefällt wird[2]).

2. Eigenschaften der Hefenukleinsäure.

Die Hefenukleinsäure gehört zu den zusammengesetzten Nukleinsäuren; mehrere verschiedene einfache Nukleinsäuren sind zu einem größeren Komplex miteinander verbunden.

Nach den Untersuchungen von *Levene* besteht sie aus 4 Molekülen Phosphorsäure, 4 Molekülen Pentose (d-Ribose) und 4 stickstoffhaltigen Körpern: Guanin, Adenin, Zytosin, Urazil.

Nach den Untersuchungen von *K. Kowalewski* ist das Urazil kein primäres Spaltprodukt, sondern entsteht aus Zytosin, so daß die Hefenukleinsäure aus 3 Molekülen Phosphorsäure, 3 Molekülen d-Ribose und aus 3 stickstoffhaltigen Körpern besteht: Guanin, Adenin, Zytosin: $C_{29} H_{42} O_{23} N_{13} P_3$.

3. Nachweis der Hefenukleinsäure.

Der Nachweis der Hefenukleinsäure muß sich auf den Nachweis der Spaltstücke und des richtigen Verhältnisses von N : P in der reinen Substanz gründen (berechnet nach der Formel $C_{29} H_{42} O_{23} N_{13} P_3$). Sie reduziert *Fehling*sche Lösung erst nach dem Kochen mit Schwefelsäure. Sie dreht rechts, die Drehung hängt aber von der Alkaleszenz der Lösung ab.

E. Darstellung der Plasminsäure[3]).

Die Isolierung der zuerst von *Kossel* beschriebenen Plasminsäure $C_{15} H_{28} N_6 P_6 O_{30}$, die aus der Hefe dargestellt werden kann und über deren genetische Beziehung zur Hefenukleinsäure vorläufig nichts bekannt ist, geschieht am besten nach folgender Methode.

---

[1]) *Levene*: Biochem. Zeitschr. **17**. 120 (1909); *Levene* und *Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 2474 und 2703 (1909).

[2]) *Kowalewski*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**. 240 (1910).

[3]) *A. Ascoli*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 426 (1899).

12 *l* untergärige gepreßte Hefe werden in 3 *l* 30%iger Natronlauge gelöst, nach etwa einer Viertelstunde die Lösung mit 2 *l* Wasser verdünnt, mit 2 *l* 48%iger Eisenchloridlösung gefällt und die Masse durch Spitzbeutel filtriert. Das etwa 4 bis 5 *l* betragende braune Filtrat wird in das gleiche Volumen einer Mischung von konzentrierter Salzsäure und 85%igem Alkohol unter Umrühren hineingegossen. Die Salzsäuremenge muß eben ausreichen, um die Flüssigkeit sauer zu machen und wird jedesmal durch Titrierung des alkalischen Filtrates ermittelt. Man läßt den Niederschlag sich absetzen, hebert die darüber stehende Flüssigkeit ab, zentrifugiert den Niederschlag, wäscht und trocknet ihn mit Alkohol und Äther und bringt ihn in das Vakuum. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt (A) beträgt 40 bis 80 *g*, sein Phosphorgehalt 5 bis 10%, im Mittel 7%. Es wird mit Wasser extrahiert, darauf filtriert; das gelbe Filtrat von neuem mit Salzsäure und Alkohol, dem etwas Äther zugesetzt wird, gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und ins Vakuum gebracht. Die Ausbeute an diesem zweiten Produkt (B) beträgt 5 bis 10 *g*, sein Phosphorgehalt 13 bis 23%, gewöhnlich 14%. Wird B mit 0·10%iger wässeriger Salzsäure extrahiert, das opalisierende Filtrat durch Alkohol und etwas Äther gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet, so erhält man die Plasminsäure; der in wässeriger Salzsäure ungelöst bleibende Teil, der auch ganz fehlen kann, ist Nukleinsäure. Ausbeute an Plasminsäure 4 bis 5 *g* aus 12 *l* Hefe.

F. Darstellung der Tritikonukleinsäure[1]).

Die Nukleinsäure aus dem Weizenembryo, Tritikonukleinsäure, wurde von *Osborne* und *Harris* dargestellt und untersucht.

Das Weizenembryonenmehl wird mit Wasser extrahiert, das Wasserextrakt mit Kochsalz und Essigsäure gefällt, der Niederschlag durch Pepsinverdauung von Eiweiß befreit und das Ungelöste durch Lösen in Kalilauge und Fällen mit Salzsäure gereinigt.

Die Tritikonukleinsäure ist wahrscheinlich mit der Hefenukleinsäure identisch[2]); sie liefert dieselben Spaltstücke wie diese.

G. Darstellung der Inosinsäure.

Die I n o s i n s ä u r e, $C_{10}H_{13}N_4PO_8$, gehört zu den einfachen Nukleinsäuren; sie besteht nach den Ergebnissen der hydrolytischen Aufspaltung aus je einem Molekül Hypoxanthin, d-Ribose und Phosphorsäure.

$$C_{10}H_{13}O_8N_4P + 2\,H_2O = \underset{\text{Hypoxanthin}}{C_5H_4ON_4} + \underset{\text{Pentose}}{C_5H_{10}O_5} + H_3PO_4.$$

[1]) *Osborne* und *Harris*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **36.** 85 (1902).
[2]) *Levene* und *Laforge*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43.** 3164 (1910).

Bei weniger eingreifender Hydrolyse erhält man Bruchstücke, in denen die Pentose entweder mit dem Hypoxanthin oder der Phosphorsäure noch dem Zusammenhang bewahrt hat.

$$\underset{\text{Inosin}}{C_{10}H_{12}O_5N_4} + H_2O = \underset{\text{Hypoxanthin}}{C_5H_4ON_4} + \underset{\text{d-Ribose}}{C_5H_{10}O_5} \quad .\ .\ 1)$$

$$\underset{\text{d-Ribosephosphorsäure}}{C_5H_{11}O_8P} + H_2O = H_3PO_4 + \underset{\text{d-Ribose}}{C_5H_{10}O_5} \quad .\ .\ .\ .\ 2).$$

Da man unter den Bedingungen, welche zur Bildung von Trioxyglutarsäure aus Pentose führen, aus der d-Ribosephosphorsäure Ribonsäure erhält, so muß die Phosphorsäure an das δ-Kohlenstoffatom der Pentose gebunden sein[1]). Es ist demnach die Inosinsäure eine Hypoxanthyl-d-ribosid-δ-phosphorsäure. Zweifelhaft ist nur noch, ob die α- oder β-Form des Pentosides vorliegt. Die Verhältnisse werden durch folgende zwei Formeln ausgedrückt.

```
                                               OC — NH
HO\                 H  H  H  H                  |    |
 O=P . O CH2 . C . C . C . C — N — C    CH
HO/                 O  OH OH |  CH<        ‖    ‖
                    |________|              N — C — N

                                                       OC — NH
                                                        |    |
HO\                 H  H  H  H           /NH — C   CH
 O=P . O CH2 . C . C . C . C — C<               ‖    ‖
HO/                 O  OH OH|            \N ——— C — N
                    |_______|
```

1. Die Darstellung der Inosinsäure geschieht am besten nach der von *Haiser* angegebenen Methode[2]):

1 *kg* Fleischextrakt wird am Rückflußkühler mit mehrfach (drei- bis viermal) gewechseltem absoluten Alkohol (je 8 *l*) ausgekocht, bis der Rückstand eine zerreibliche Masse geworden ist. Sie wird in mäßig warmem Wasser (2 bis 3 *l*) gelöst, filtriert und das Filtrat vorsichtig mit Barytwasser ausgefällt, bis sämtliche anorganischen Phosphate niedergeschlagen sind. Da die Inosinsäure ein schwer lösliches basisches Bariumsalz bildet, so liegt die Gefahr nahe, daß in den Barytniederschlag auch die Inosinsäure mit hineingeht. Man prüft also von Zeit zu Zeit während des Barytzusatzes, ob das Filtrat noch eine starke Phosphorsäurereaktion zeigt und betrachtet in dem Zeitpunkt die Fällung als beendet, wenn die Reaktion nur noch äußerst schwach auftritt. Der ent-

[1]) *Levene* und *Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 746 (1911).
[2]) Monatsh. f. Chem. **16**. 190.

standene Niederschlag besteht vorwiegend aus phosphorsaurem und Spuren von schwefelsaurem Baryt. Das Filtrat, welches nun stark alkalisch reagiert, wird mit verdünnter Schwefelsäure genau neutralisiert und hierauf mit einer konzentrierten Lösung von Silbernitrat so lange versetzt, bis durch weiteren Zusatz desselben die Bildung eines Niederschlages nicht mehr erfolgt. Die Ausscheidung besitzt anfänglich eine gelbbraune Farbe, ist sehr volumi, nös und verändert beim längeren Stehen, namentlich am Lichte· ihre Farbe. Man filtriert deshalb rasch, wäscht mit kaltem Wasser so lange, bis die Hauptmenge der Lauge entfernt ist und zersetzt den Niederschlag in der Kälte mit Schwefelwasserstoff. Dabei scheidet sich das Schwefelsilber meist so fein ab, daß eine Abtrennung desselben durch Filtration nicht durchführbar ist. Nach beendeter Zersetzung verdrängt man den Schwefelwasserstoff durch anhaltendes Durchleiten eines Luftstromes, bringt dann die Masse in eine Schale und erwärmt, nachdem man vorher kohlensaures Barium eingetragen hat.

Daß das Erwärmen erst nach dem Zusatze des letzteren erfolgen darf, kann nicht genug hervorgehoben werden, da Lösungen von freier Inosinsäure sich in der Hitze ziemlich rasch zersetzen. Nach dem Aufkochen zeigt die Flüssigkeit neutrale Reaktion und läßt sich nunmehr in der Regel vom Schwefelsilber und dem Überschuß des Bariumkarbonates filtrieren. Die Lösung wird hernach auf dem Wasserbade, bei etwa 80°, auf zirka 250 cm^3 eingeengt. Wenn nun die Flüssigkeit einige Zeit gestanden hat, beginnt die Ausscheidung von prächtig glänzenden Blättchen, die vorwiegend aus inosinsaurem Baryt bestehen. Sie werden, wenn sie sich nicht mehr vermehren, was nach zirka 12 Stunden der Fall ist, von der Mutterlauge durch Absaugen getrennt. Diese besitzt meist eine dunkle Farbe und liefert beim weiteren Eindunsten nur höchst unbedeutende Mengen des Salzes. Die abgesaugte Masse löst man in Wasser von 80° und entfärbt mit Tierkohle. Nach dem Filtrieren beginnt bei entsprechender Konzentration der Lösung eine reichliche Ausscheidung vierseitiger Blättchen, die Perlmutterglanz besitzen und die sich so rasch vermehren, daß nach kurzer Zeit das Ganze zu einem Kristallbrei erstarrt. Nach dem Trocknen der von der Mutterlauge getrennten Kristalle hat die Substanz das Aussehen von poliertem Silber, eine Eigentümlichkeit, die auch *Liebig* betont. Ausbeute: Aus 1 *kg* Fleischextrakt 5 bis 7 *g* reines Barytsalz, doch enthält das Fleischextrakt nicht immer diese Mengen Inosinsäure.

2. Eine andere Methode zur Darstellung der Inosinsäure ist von *Bauer*[1]) angegeben:

---

[1]) *Bauer*: Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **10**. 345 (1908).

500 *g Liebig*sches Extrakt werden in 2·5 *l* Wasser gelöst, die Lösung mit 40 *g* Tierkohle verrührt und im Brutschrank (bei 37°) unter oftmaligem Umrühren sich selbst überlassen. Dann wird die Flüssigkeit eine halbe Stunde lang mit der Schüttelmaschine geschüttelt, hernach sofort filtriert. Das Filtrieren nimmt lange Zeit in Anspruch; es wird dadurch die Lösung von allerhand Verunreinigungen befreit, vor allem von geringen Mengen einer kolloidalen Substanz, die sonst das weitere Arbeiten außerordentlich erschwert. Das Filtrat, eine dunkelrote bis braune Flüssigkeit, die ganz klar sein soll, wird mit Wasser auf 5 *l* verdünnt.

Nun werden die anorganischen Phosphate durch Fällung mit einer 20%igen Lösung von Bariumazetat beseitigt, doch soll ein Überschuß an Azetat vermieden werden. Dann wird von einer kaltgesättigten Lösung von Bariumhydroxyd so lange zugesetzt, bis die vorher saure Reaktion schwach alkalisch zu werden beginnt. Es wird dann filtriert und das Filtrat noch genau auf die Anwesenheit von Phosphorsäure geprüft, doch darf bei den Phosphorproben mit konzentrierter Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon nicht zu stark erhitzt werden, da sonst organisch gebundener Phosphor frei wird. Wird noch anorganischer Phosphor nachgewiesen, so muß derselbe durch nochmaligen Zusatz von Bariumazetat und Bariumhydroxyd beseitigt werden.

Die vom Phosphat befreite Lösung gibt nach dem Kochen mit konzentrierter Salpetersäure neuerlich eine starke Phosphorsäurereaktion mit molybdänsaurem Ammoniak durch Abspaltung des organisch gebundenen Phosphors.

Es wird nun eine Lösung von basischem Bleiazetat so lange zugesetzt, bis keine weitere Fällung mehr entsteht, der Niederschlag von der Flüssigkeit durch Filtrieren oder noch besser durch Zentrifugieren getrennt, schließlich auf dem Saugfilter abgesaugt. Der Niederschlag wird einer dreimaligen Waschprozedur unterzogen, deren genaue Ausführung sehr wichtig für die Erzielung einer guten Ausbeute ist. Der Niederschlag wird mit etwa 1·5 *l* Wasser in der Reibschale sorgfältig verrührt und auf der Nutsche abgesaugt; beim dritten Waschen kann man den Niederschlag nur absaugen, wenn man auf das Nutschfilter eine Schicht fein gepulverten Bariumkarbonates gestreut hat.

Der so mit Bariumkarbonat vermengte Niederschlag wird wieder verrieben, aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffes in der Kälte nochmals mit basischem Bleiazetat bis zur vollständigen Ausfällung zersetzt. Der Niederschlag wird wieder, wie oben beschrieben, dreimal durch Aufschwemmen gewaschen, wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt, wobei man ein schwach gelb gefärbtes Filtrat erhält. Dieses wird nach Entfernung des Schwefelwasser-

stoffes bei niederer Temperatur (etwa 40°) langsam eingedampft. Dazu werden große, etwa 4 bis 5 *l* fassende Schalen mit flachem Boden benützt, die am besten in einen großen Brutraum, der 40° hält, hineingestellt werden. Es treten allmählich am Boden Kriställchen auf, die zum Teil kugelige Drusen bilden. Ist der Schaleninhalt bis auf etwa 30 cm^3 eingedampft, so wird die ganze Masse in ein Spitzglas gebracht, nach dem Absetzen der Kristalle der überstehende Sirup abgegossen und die zarte Kristallmasse durch mehrmaliges Aufschwemmen mit ganz wenig Wasser von den Resten des Sirups annähernd befreit; sie stellt dann eine lachsrote Masse dar, die durch Umkristallisieren aus heißem Wasser von der rot gefärbten Substanz befreit wird und dann millimeterlange schöne Nädelchen bildet, die durch nochmaliges Umkristallisieren schneeweiß erhalten werden. Ausbeute: 3 *g* Barytsalz aus 1 *kg* Fleischextrakt.

3. Zweite Darstellungsmethode nach Haiser[1]).

Das Extrakt wird in etwa 5 Teilen warmen Wassers von ungefähr 40° gelöst und Bariumhydrat zugesetzt, bis kein Niederschlag erfolgt. Man scheue sich nicht davor, daß im Filtrate Baryt erscheint, sondern setze so lange Baryt zu, als im Filtrate noch ein Niederschlag entsteht. Es wird hiebei aus so verdünnter Lösung weder Inosinsäure noch Karnin gefällt, was bei Inosinsäure wenigstens in konzentrierterer Lösung der Fall wäre. Nach dem Absaugen des Barytniederschlages, der übrigens nach dem Auswaschen mit heißem Wasser nur Spuren von organischen Substanzen enthält, wird die starke alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure neutralisiert. Sodann wird in der Kälte mit Bleiessig ausgefällt, indem man so lange davon zusetzt, bis eben kein Niederschlag mehr entsteht. Ein Überschuß ist zu vermeiden, da dieser lösend auf den Niederschlag wirkt. Aus dem mit kaltem Wasser gut ausgewaschenen Niederschlage gewinnt man nach Zerlegung mit Schwefelwasserstoff in der Kälte, Aufkochen mit Bariumkarbonat und Einkochen des Filtrates im Vakuum den inosinsauren Baryt, und zwar 5 bis 6 *g* aus einem Pfund Fleischextrakt. Die Ausbeute hängt ganz von der Frische desselben ab; aus alten dunkelbraunen Sorten wurde oft nicht die Spur gewonnen, aus ganz frischen hellgelben dagegen 7 *g*.

Das Filtrat von der Bleiessigfällung wird mit Ammoniak versetzt, wobei abermals ein Bleiniederschlag entsteht, der das Karnin enthält. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Dies kann in der Hitze vorgenommen werden, geschieht jedoch zweckmäßiger

[1]) *Haiser* und *Wenzel*: Monatsh. f. Chem. **29**. 157.

auch in der Kälte, damit etwa entstandene freie Säuren keine Zersetzung hervorrufen. Noch vor dem Abfiltrieren des Bleisulfides werden die Säuren mit Bariumkarbonat neutralisiert, hierauf wird filtriert und zum Sirup eingedampft. Nach dem Impfen mit Karninkristallen oder nach 24stündigem Stehen kommt die ganze Masse zur Kristallisation. Die Kristalle werden abgesaugt, kalt gewaschen und drei- bis viermal unter Eindampfen mit wenig Tierkohle aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt ebenfalls 5 bis 6 *g* pro Pfund frischen Fleischextraktes.

4 Eigenschaften der Inosinsäure.

Die freie Inosinsäure $C_{10}H_{13}N_4PO_8$ kristallisiert nicht und zersetzt sich leicht.

Das Bariumsalz $C_{10}H_{11}N_4PBaO_8$ kristallisiert mit 7·5 Molekülen Kristallwasser, von denen 6·5 Moleküle bei 100 bis 105° entweichen; das letzte Molekül entweicht erst bei 100° im Vakuum.

Für $C_{10}H_{11}N_4OBaO_8 + H_2O$ bei 100 bis 105° getrocknet, berechnet sich C 23·95%, H 2·59%, N 11·17%, P 6·18%, Ba 27·34%.

Das lufttrockene Salz gibt bei 100 bis 105° 6·5 Moleküle Kristallwasser ab = 19·17% H_2O.

Das Kalziumsalz kristallisiert in farblosen, durchsichtigen, monoklinen Prismen, die in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich sind. Das Salz enthält Kristallwasser, das bei 100 bis 105° bis auf 1 Molekül entweicht.

$C_{10}H_{11}N_4CaPO_8 + H_2O$ verlangt 9·51% Ca und 7·73% P.

Das Kali- und Ammoniumsalz sind äußerst hygroskopische Körper, die nur schwierig kristallisieren, das Kupfersalz ist in Wasser unlöslich, in Ammoniak löslich; das Silbersalz fällt in einer neutralen Lösung als gelatinöser weißer Niederschlag, löslich in Salpetersäure und in Ammoniak.

Die Inosinsäure reduziert nicht *Fehling*sche Lösung, wohl aber nach dem Sieden mit Mineralsäuren und nach Entfernung des Hypoxanthins, sie gibt intensive Pentosenreaktion mit Orzin und Phlorogluzin, sie ist linksdrehend $[\alpha)_D = -18·5°$.

Inosin.

Molekulargewicht = 268 (feine, seidenglänzende Nadeln):

$C_{10}H_{12}N_4O_5$ 44·77% C, 4·47% H, 20·89% N. F. P. = 218° (korr.) $\alpha_D^{20} = -72·45°$. Aus alkalischer Lösung scheidet sich bei längerem Stehen das Na-Salz in langen Prismen ab.

Löslichkeit in Wasser bei 20° 1·615 *g* Inosin in 100 *cm*³ Wasser. Zum Umkristallisieren dient am besten 80%iger Alkohol.

5. Darstellung von d-Ribonsäure aus d-Ribosephosphorsäure[1]).

Die d-Ribosephosphorsäure wird durch einstündiges Kochen von inosinsaurem Baryt mit 1% H Cl erhalten.

Ba-Salz: $Ba . C_5 H_9 O_8 P + 5 \frac{1}{2} H_2 O$, sechseckige Platten aus Wasser, geht leicht in ein basisches Salz über.

Durch 24stündiges Stehen der aus dem Ba-Salz mit $H_2 SO_4$ als Sirup erhaltenen d-Ribosephosphorsäure mit Salpetersäure (D 1 · 2) bei 40° erhält man Phosphoribonsäure.

Ca-Salz: $Ca_3 (C_5 H_8 O_9 P)_2$, mikroskopische, kugelige Aggregate ziemlich leicht löslich im kalten Wasser, wenig löslich im heißen Wasser, zieht an der Luft Kohlensäure an.

Beim Auflösen in Mineralsäuren wandelt sich die freie Säure in Lakton um. Das Salz stimmt in allen Eigenschaften mit dem aus d-Ribosephosphorsäure durch Oxydation mit Brom erhaltenen überein.

Durch neutrale Hydrolyse (bei 130° in Ammoniumazetatlösung 3 Stunden lang) wird die Phosphorsäure abgespalten und d-Ribonsäure erhalten.

$Cd (C_5 H_9 O_6)_2$: Kristalle aus wenig Wasser.

H. Darstellung der Guanylsäure.

Die Guanylsäure wurde zuerst von *Bang*[2]) aus dem Nukleoproteid des Pankreas dargestellt; sie ist auch in anderen Organen[3]) aufgefunden worden.

1. Darstellung des Nukleoproteids aus Pankreas nach Hammersten[4]).

Frische Drüsen, direkt aus dem Schlachthaus bezogen, werden zerkleinert und mit Wasser rasch zum Sieden erhitzt; nach dem Erkalten wird filtriert und aus dem hellbernsteingelben Filtrat das Nukleinproteid durch Zusatz von 5 bis 10‰iger Essigsäure ausgefällt. Die Fällung wird zur Reinigung in Wasser gelöst und noch einmal mit Säure wieder ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet. Es resultiert ein feines, staubendes, weißes Pulver; Phosphorgehalt durchschnittlich 4·5% P.

---

1) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 746 (1911).

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 133 (1898/99).

3) *Jones* und *Rountree*: Journ. biol. chem. **4**. 289; *Levene* und *Mandel*: Biochem. Zeitschr. **10**. 221 (1908).

4) *Hammarsten*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**. 19 (1894).

2. Darstellung der Guanylsäure[1]) aus dem Nukleoproteid nach Bang.

Portionen von je 12 *g* Proteid werden mit 400 *cm*³ 2%iger Kalilauge versetzt und eine halbe Stunde lang im siedenden Wasserbade gehalten, dann mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und kochend heiß filtriert. Am nächsten Tage hat sich ein Bodensatz abgeschieden, der filtriert und aus heißem Wasser umgelöst wird. Dann wird der Niederschlag in 1%iger Kalilauge gelöst, vom Ungelösten filtriert und zum Filtrat 5%ige Essigsäure im geringen Überschuß zugesetzt, der Niederschlag filtriert, mit Alkohol gewaschen und mit Äther getrocknet. Ausbeute zirka 10% des Ausgangsmaterials. Phosphorgehalt des Präparates zirka 7·5%, Stickstoffgehalt 18%.

Man erhält auf diese Weise ein saures Kaliumsalz der Guanylsäure mit 6·68% K. Dies kann man mit Bariumazetat zu einem Ba-Salz umsetzen[2]).

3. Darstellung der Guanylsäure nach Levene[2]).

Pankreasdrüsen werden zerhackt, mit Wasser aufgekocht und in die Mischung Kaliumazetat bis zu einem Gehalt von 5% eingetragen, nach dem Abkühlen wird mit 50% Kalilauge bis zu 5% versetzt. Es wird dann das Eiweiß mit Pikrinsäure und Essigsäure entfernt. Das enteiweißte Filtrat enthält die Thymonukleinsäure und die Guanylsäure. Zur Trennung beider wird 25% Bleizuckerlösung eingetragen; der Niederschlag enthält das Bleisalz der Thymonukleinsäure; in dem Filtrat bildet sich nach Zugabe von Ammoniak ein weiterer Niederschlag, der je nach der Drüse aus einer Bleiverbindung entweder der Guanylsäure oder der Guanylsäure und des Guanosins besteht. Das Rohprodukt der freien Guanylsäure und des Guanosins wird durch einen Überschuß von Ammoniak in heißem Wasser gelöst und in Alkohol filtriert. Es bildet sich dabei ein Niederschlag des Ammoniumsalzes der Guanylsäure, das Filtrat enthält das Guanosin.

4. Eigenschaften der Guanylsäure.

Die Guanylsäure ist ebenfalls eine einfache Nukleinsäure und vollkommenes Analogon der Inosinsäure, an Stelle von Hypoxanthin enthält sie Guanin.

$$\underset{\text{Guanylsäure}}{C_{10}H_{14}O_8N_5P} + 2\,H_2O = \underset{\text{Guanin}}{C_5H_5N_5O} + \underset{\text{d-Ribose}}{C_5H_{10}O_5} + H_3PO_4.$$

¹) *Bang*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 133 (1898/99); *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**. 540 (1907); *Steudel* und *Brigl*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**. 40 (1910).

²) *Levene* und *Jacobs*: Biochem. Zeitschr. **28**. 127 (1910).



Bei teilweiser Spaltung erhält man Spaltstücke, in denen die Pentose entweder mit dem Guanin oder mit der Phosphorsäure ihren Zusammenhang noch bewahrt hat.

$$C_{10} H_{13} O_5 N_5 + H_2 O = C_5 H_5 O N_5 + C_5 H_{10} O_5 \quad . \; . \; . \quad 1)$$

Guanosin Guanin d-Ribose

$$C_5 H_{11} O_8 P + H_2 O = C_5 H_{10} O_5 + H_3 P O_4 \quad . \; . \; . \quad 2).$$

d-Ribosephosphorsäure d-Ribose

Die Guanylsäure ist im Gegensatz zur echten Nukleinsäure in Essigsäure unlöslich, in Salzsäure leicht löslich. Beim längeren Stehen in salzsaurer Lösung wird sie zersetzt. In warmem Wasser ist sie leichter löslich wie in kaltem, sie fällt also beim Abkühlen der Lösung teilweise aus, Löslichkeit in kaltem Wasser 0·3%. Die Alkalisalze sind leicht in Wasser löslich, die Schwermetallsalze in Wasser nicht löslich.

Guanylsaures Bruzin $(C_{23} H_{26} O_4 N_2)_2 . C_{10} H_{14} O_8 N_5 P$ kristallisiert aus 30% Alkohol in Platten und ist schwer löslich in kaltem Wasser und Alkohol, leichter in heißem Wasser[1]).

Bariumsalz: $Ba\, C_{10} H_{12} O_8 N_5 P$, weißes, amorphes Pulver, zieht an der Luft Kohlensäure an, eine Lösung in $^1/_1$-n-Salzsäure (0·3075 *g* in 4 *cm*³) zeigt im 20 *mm*-Rohr $[\alpha]_D^{25} = -0{\cdot}13^0$; daraus berechnet sich für die freie Säure $[\alpha]_D^{25} = -1{\cdot}27^0$.

Guanylsaures Kali (4 *g*) in 100 *cm*³ Wasser gelöst, drehen im 22 *cm*-Rohr bei 80° 3·1° nach links; in verdünnten Mineralsäuren schwache Rechtsdrehung[2]).

Die Salze der Alkalien mit Guanylsäure gelatinieren.

Die Guanylsäure wird nach *Bang* von Gerbsäure und Pikrinsäure, ebenso von Phosphorwolframsäure in saurer Lösung gefällt.

Sie gibt keine *Millon*sche und Biuretreaktion; sie reduziert *Fehling*sche Lösung nicht, wohl aber nach dem vorherigen Kochen mit Salzsäure oder Schwefelsäure und Entfernung des Guanins.

Die Guanylsäure ist rechtsdrehend.

J. 1. Darstellung der Xanthylsäure nach M. Knopf[3]).

So wie das Xanthin dem Guanin entspricht, entspricht der Guanylsäure die Xanthylsäure. Sie entsteht aus der Guanylsäure durch gelinde Oxydation mit salpetriger Säure.

$$H_2 N . C_{10} H_{12} N_4 O_8 P + H NO_2 = HO . C_{10} H_{12} N_4 O_8 P + H_2 O + N_2.$$

[1]) *Levene* und *Jacobs*: Journ. biol. chem. **12**. 421 (1912).

[2]) *Steudel* und *Brigl*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**. 40 (1910).

[3]) *Knopf*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**. 159 (1914).

20 *g* guanylsaures Natrium, die aus dem Nukleoproteid vom Rinderpankreas nach der Methode von *Bang* dargestellt worden waren, werden in einem Filterstutzen von 750 cm^3 Inhalt in 400 cm^3 Wasser verteilt; unter Turbinieren gibt man allmählich je 100 *g* Natriumnitrit und 100 cm^3 Eisessig hinzu, nach ungefähr 5 Stunden ist eine klare gelbe Lösung entstanden. Um starkes Schäumen zu verhindern, ist der Zusatz einer geringen Menge Äther oder Amylalkohol von Vorteil. Aus der Lösung kann man mit der fünffachen Menge Alkohol die Xanthylsäure als teigige Masse fällen, die nach dem Abgießen der Mutterlauge durch Zusatz von Alkohol und Verreiben gehärtet wird. Das rohe Produkt ist ein gelbes hygroskopisches Pulver. Zu einem reinen Körper kommt man, wenn man die Säure aus der Reaktionsflüssigkeit mit schwefelsaurer Quecksilbersulfatlösung (*Hopkin*sche Lösung) fällt, wie es *Levene*[1]) für die Reindarstellung der Guanylsäure getan hat. Dann entsteht ein weißer voluminöser Niederschlag, der mit kaltem Wasser mehrmals digeriert und dekantiert wird und zum Schluß auf der Nutsche abgesaugt und mit heißem Wasser gewaschen wird. In Wasser suspendiert, wird er sodann mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Lösung zur Ausflockung des kolloidal gelösten Quecksilbersulfides mit Bariumkarbonat geschüttelt und filtriert. Zu dem baryt- und schwefelsäurefreien Filtrat gibt man die berechnete Menge Bruzin, in Alkohol gelöst, nachdem man durch Titration die Azidität festgestellt hat. Wenn das Bruzinsalz nicht auskristallisiert, konzentriert man die Lösung bei vermindertem Druck, bis die Ausscheidung beginnt. Etwa überschüssig zugesetztes Bruzin wird mit Chloroform extrahiert. Aus 30%igem Alkohol kristallisiert das Salz in schönen langen, farblosen Nadeln, die gegen 200° zu schmelzen beginnen.

2. Eigenschaften der Xanthylsäure.

Die Xanthylsäure ist in Wasser leicht löslich und wird von Säuren nicht gefällt. Sie fällt mit Quecksilbersalzen, Kupfersalzen und Silbersalzen, das erstere ist löslich in Alkalien, die beiden letzteren im Ammoniak. Aus konzentrierten Lösungen fällen allmählich Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure die Nukleinsäure aus.

Sie ist rechtsdrehend. Bei der Hydrolyse mit Mineralsäure liefert sie als einzigen N-haltigen Baustein Xanthin.

---

[1]) *Levene*: Journ. biol. chem. **12**. 421 (1912).

Vollständiger Abbau der Nukleinsäure, Nachweis der Bausteine, deren Darstellung.

Von **H. Steudel**, Berlin.

Der Abbau der Nukleinsäure kann nach verschiedenen Grundsätzen erfolgen. Entweder sucht man durch vorsichtige Einwirkung von Spaltungsmitteln einzelne Teile von dem großen Molekül loszulösen, um dann Substanzen zu erhalten, die der ursprünglichen Nukleinsäure noch relativ nahe stehen, oder man spaltet sofort das ganze Molekül bis in seine einfachen Bruchstücke auf.

Dies letztere geschieht am besten durch siedende Mineralsäuren, Jodwasserstoffsäure[1]), Salzsäure[2]) oder Schwefelsäure[3]), als deren zweckmäßigste und am mildesten wirkende sich die Schwefelsäure[3]) erwiesen hat. Früher hatten *Kossel* und *Neumann*, lediglich um einfachere Bedingungen in der resultierenden Zersetzungsflüssigkeit zu haben, die Nukleinsäure mit starker (20 Volumprozent) Schwefelsäure unter Druck bei 150° erhitzt. Dabei werden die Alloxurbasen ganz oder doch fast ganz zerstört[3]) und hindern dann nicht die Isolierung der anderen Produkte. Aber um nur eine vollkommene Spaltung zu erreichen, ist solch ein eingreifender Prozeß nicht nötig, es genügt ein mehrstündiges Sieden mit mäßig starker Schwefelsäure unter gewöhnlichem Druck. Unter solchen Umständen zerfällt die Thymusnukleinsäure in eine ganze Reihe von Spaltungsprodukten, die sich zweckmäßig in 3 Gruppen anordnen lassen:

1. Gruppe: Alloxurbasen: Guanin, Adenin, Xanthin, Hypoxanthin.
2. „ Pyrimidinkörper: Zytosin, Urazil, Thymin.
3. „ Kohlenhydratderivate: Ameisensäure, Lävulinsäure, ferner Ammoniak und Phosphorsäure.

---

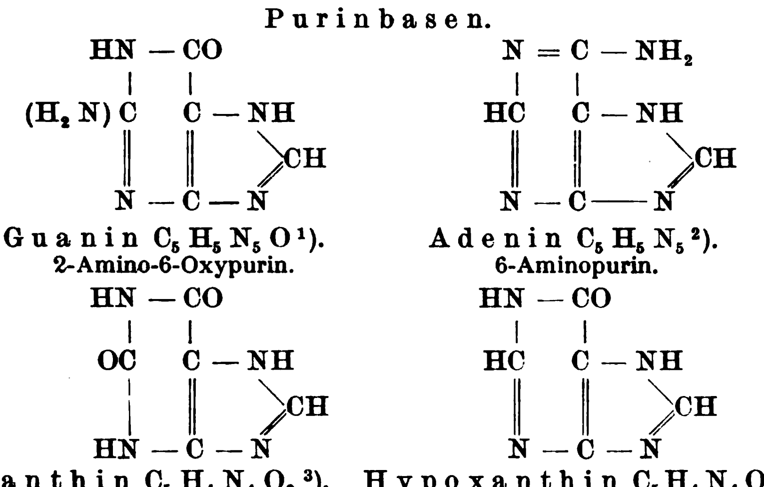
[1]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**. 165 (1904).
[2]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 402 (1904/05).
[3]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 332 (1905).

1. Stickstoffhaltige Spaltungsprodukte der Thymusnukleinsäure.

Name des Spaltungsproduktes	Als Spaltungsprodukt der Nukleinsäure nachgewiesen von	Konstitution nachgewiesen von
I. Alloxurbasen:		
Hypoxanthin	*A. Kossel* 1879 (Zeitschr. f. physiol. Chem. III. 291)	6-Oxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2228)
Xanthin	*A. Kossel* 1880 (Zeitschr. f. physiol. Chem. IV. 292)	2.6-Dioxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2235)
Guanin	*A. Kossel* 1882 (Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**. 15)	2-Amino-6-oxypurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2253)
Adenin	*A. Kossel* 1885 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**. 79, 1928)	6-Aminopurin *E. Fischer* 1897 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2241)
II. Pyrimidinkörper:		
Thymin	*A. Kossel* und *A. Neumann* 1894 (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**. 2215)	5-Methyl-2-6-dioxypyrimidin *H. Steudel* 1901 (Zeitschr. f. phys. Chem. **32**. 241)
Urazil	*A. Ascoli* 1900 (Zeitschr. f. phys. Chem. **31**. 161)	2.6-Dioxypyrimidin *H. Steudel* 1901 (Zeitschr. f. phys. Chem. **32**. 244)
Zytosin	*A. Kossel* und *H. Steudel* 1902 (Zeitschr. f. phys. Chem. **37**. 177)	6-Amino-2-oxypyrimidin *A. Kossel* und *H. Steudel* 1903 (Zeitschr. f. phys. Chem. **37**. 377; **38**. 49)

2. Konstitution der stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte der Thymusnukleinsäure.

Purinbasen.



Guanin $C_5H_5N_5O$[1]). 2-Amino-6-Oxypurin.

Adenin $C_5H_5N_5$[2]). 6-Aminopurin.

Xanthin $C_5H_4N_4O_2$[3]). 2.6-Dioxypurin.

Hypoxanthin $C_5H_4N_4O$[4]). 6-Oxypurin.

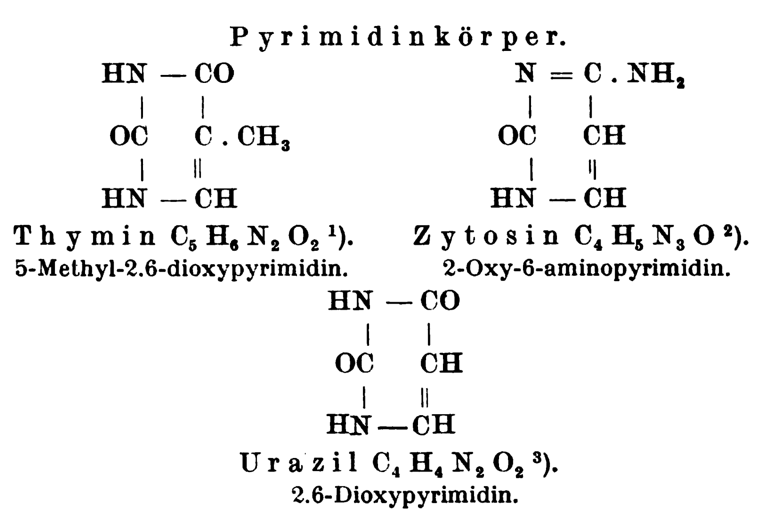
---

[1]) *A. Strecker*: Verwandlung des Guanins in Xanthin. Ann. d. Chem. **108**. 141 (1859); Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Guanin, Xanthin, Theobromin, Kaffein und Kreatinin. Ann. d. Chem. **118**. 151 (1861); *E. Fischer*: Umwandlung des Xanthins in Theobromin und Kaffein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **15**. 453 (1882); *C. Wulff*: Beiträge zur Kenntnis der Nukleinbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**. 468 (1892); *E. Fischer*: Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2253 (1897); Synthesen in der Puringruppe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**. 445 (1899).

[2]) *A. Kosel*: Über eine neue Base aus dem Tierkörper. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**. 79 (1885); Über das Adenin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**. 1928 (1885); Über das Adenin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**. 250 (1886); **12**. 241 (1888); *G. Bruhns*: Über ein Bromierungsprodukt des Adenins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**. 4 (1892); *M. Krüger*: Zur Kenntnis des Adenins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**. 167 (1892); *E. Fischer*: Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2241 (1897).

[3]) *F. Wöhler* und *J. Liebig*: Untersuchung über die Natur der Harnsäure. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **26**. 340 (1838); *Scherer*: Über Hypoxanthin, Xanthin und Guanin im Tierkörper und den Reichtum der Pankreasdrüse an Leuzin. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **112**. 257 (1859); *G. Städeler*: Über das Xanthin. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **111**. 28 (1859); *A. Strecker*: Verwandlung des Guanins in Xanthin. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **108**. 141 (1859); *E. Fischer*: Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2235 (1897).

[4]) *Scherer*: Über einen im tierischen Organismus vorkommenden, dem Xanthinoxyd verwandten Körper. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **73**. 328 (1850); *A. Strecker*: Verwandlung des Guanins in Xanthin. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **108**. 156 (1859); *A. Kosel*: Über Xanthin und Hypoxanthin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **6**. 428 (1882); *M. Krüger*: Zur Kenntnis des Adenins und Hypoxanthins. III. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 422 (1893); Die Konstitution des Adenins und Hypoxanthins. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 459 (1893); *E. Fischer*: Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2228 (1897).



3. Zusammensetzung der Thymusnukleinsäure.

Der gesamte Phosphor der Nukleinsäure erscheint in der Zersetzungsflüssigkeit als Phosphorsäure wieder, die übrigen Spaltungsprodukte sind, wie Untersuchungen der Nukleinsäure mit anderen Methoden (Einwirkung von starker Salpetersäure[4]) bezw. Salzsäure[1]) bei niederer Temperatur gelehrt haben, nicht alle primär im Molekül der Nukleinsäure vorgebildet, sondern teilweise erst sekundär durch die Einwirkung der siedenden Schwefelsäure auf die primären Spaltungsprodukte durch Ammoniak-

[1]) *A. Kosel* und *A. Neumann*: Über das Thymin, ein Spaltungsprodukt der Nukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **26**. 2753 (1893); Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**. 2215 (1894); *H. Steudel* und *A. Kosel*: Über das Thymin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 303 (1900); *H. Steudel*: Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 539 (1900); Die Konstitution des Thymins. Sitzungsber. d. Marburger Ges. z. Bef. d. ges. Naturwissensch. 23. Jänner 1901; Die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 241 (1901); *E. Fischer* und *G. Roeder*: Synthese des Urazils, Thymins und Phenylurazils. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 3751 (1901); *O. Gerngroß*: Über eine Synthese des Thymins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**. 3408 (1905).

[2]) *A. Kossel* und *A. Neumann*: Darstellung und Spaltungsprodukte der Nukleinsäure (Adenylsäure). Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**. 2215 (1894); *A. Kossel* und *H. Steudel*: Über einen basischen Bestandteil tierischer Zellen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 177 (1902); Über das Zytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 377 (1903); Weitere Untersuchungen über das Zytosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 49 (1903); *H. L. Wheeler* und *T. B. Johnson*: Synthese von Aminooxypyrimidinen, 2-Amino-6-oxypyrimidin und 2-Oxy-6-aminopyrimidin. Amer. chem. Journ. **29**. 492 (1903).

[3]) *A. Ascoli*: Über ein neues Spaltungsprodukt des Hefenukleins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 161 (1900/01); *H. Steudel*: Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 539 (1900); Die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 244 (1901).

[4]) *H. Steudel*: Über die Oxydation der Nukleinsäure. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 426 (1906).

abspaltung entstanden. So läßt sich das Xanthin auf das Guanin, das Hypoxanthin auf das Adenin und das Urazil auf das Zytosin zurückführen, ebenso ist das bei dieser desamidierenden Wirkung der Schwefelsäure freiwerdende Ammoniak ein sekundäres Zersetzungsprodukt.

Die Körper der dritten Gruppe sind Derivate eines Kohlenhydrates von 6 C-Atomen, dessen nähere Definition noch aussteht; man kann aber aus der Menge der gebildeten Lävulinsäure den Schluß ziehen, daß 4 Moleküle dieses Körpers in der Nukleinsäure vorhanden sind.

Von dem Kohlenhydrat ist bisher bekannt, daß es bei der Spaltung mit Schwefelsäure Ameisensäure und Lävulinsäure, bei der Spaltung mit Salpetersäure Oxalsäure und Epizuckersäure liefert. Nach Abtrennung der Alloxurbasen läßt sich das Reduktionsvermögen des Kohlenhydrates nachweisen, ebenso wie seine Rechtsdrehung. Das Drehungsvermögen der Nukleinsäure selbst ist wahrscheinlich durch dieses rechtsdrehende Kohlenhydrat bedingt.

Nach den Untersuchungen von *Feulgen*[1]) gehört das Kohlenhydrat zu einer Gruppe von Körpern, als deren bisherigen Repräsentanten *E. Fischer*[2]) das G l u k a l beschrieben hat von der Molekulargröße $C_6 H_{10} O_4$.

In manchen Lehrbüchern findet man die Angabe, daß die Nukleinsäure auch eine Pentose in ihrem Molekül enthalte. Man hat hier entweder die echte Nukleinsäure mit der Guanylsäure oder Inosinsäure verwechselt oder hat die von *Neumann* angegebene Reaktion der Nukleinsäure mit Phlorogluzin und Salzsäure auf Pentose bezogen. Aber der Ausfall der Farbenreaktion ist nicht der gleiche wie bei einer Pentose und vor allem sind die Mengen Furfurol, die sich bei der Destillation von Nukleinsäure mit Salzsäure bilden, so minimal, daß sich daraus der Schluß auf das Vorkommen einer Pentose in der Nukleinsäure nicht rechtfertigen läßt[2]).

Demnach würde sich das Bild von der Zusammensetzung der Nukleinsäure folgendermaßen gestalten:

Guanin	10·88 %
Adenin	9·73 %
Zytosin	7·99 %
Thymin	9·08 %
Kohlenhydrat	51·90 %
Phosphorsäure ($P_2 O_5$)	20·46 %

[1]) *Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**. 154 (1914); **100**. 241 (1917).
[2]) *E Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 196 (1914).

$$C_{43}H_{51}O_{25}N_{15}P_4 + 11\,H_2O = \underset{\text{Guanin}}{C_5H_5N_5O} + \underset{\text{Adenin}}{C_5H_5N_5} + \underset{\text{Thymin.}}{C_5H_6N_2O_2} +$$

$$+ \underset{\text{Zytosin}}{C_4H_5N_3O} + \underset{\text{Kohlenhydrat.}}{4\,C_6H_{10}O_4} + 4\,H_3PO_4.$$

Die Purinbasen sind nur äußerst locker im Verbande des Nukleinsäuremoleküls befestigt. Durch Behandlung freier Nukleinsäure mit starker Salpetersäure oder Salzsäure in der Kälte bezw. bei Zimmertemperatur kann man leicht die gesamten Purinbasen als Nitrate bezw. Chloride abspalten. Man erhält dann im Filtrat einen Körper, der noch die gesamte Phosphorsäure in organischer Bindung enthält; hatte man Salpetersäure zur Abspaltung der Basen angewandt, so reduziert das Filtrat kräftig *Fehling*sche Lösung, ein Zeichen, daß die Basen irgendwie mit der reduzierten Gruppe des Kohlenhydrates in der unzersetzten Nukleinsäure in Verbindung sein müssen. Wendet man zur Aufspaltung starke Salzsäure an, so bräunt sich die Zersetzungsflüssigkeit sehr bald und sie reduziert nicht. Hier wird die Kohlehydratgruppe rasch weiter verändert, man erhält zum Schluß Melanin und Lävulinsäure.

4. Spaltung der Thymusnukleinsäure mit starker Salpetersäure[1]).

Lufttrockenes nukleinsaures Kupfer bezw. freie Nukleinsäure (z. B. 10 *g*) wird mit einer Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·2 (20 cm^3) übergossen (10 cm^3 konzentrierter Salpetersäure, spezifisches Gewicht 1·4 + 10 cm^3 Wasser). Es fällt die freie Nukleinsäure als zähe Masse zu Boden und es beginnt allmählich eine langsame und stetige Gasentwicklung der niederen Oxyde des Stickstoffes, wobei die Nukleinsäure nach und nach in Lösung geht. Nach 24 Stunden ist sie fast ganz verschwunden und an ihrer Stelle findet sich ein reichlicher kristallinischer Bodensatz, über dem eine etwas visköse Flüssigkeit steht. Öfteres Reiben mit einem Glasstabe befördert die Abscheidung der Kristalle. Trennt man nach mehrtägigem Stehen den Bodensatz von der Flüssigkeit, so erhält man ein grauweißes Pulver, das mit verdünnter Salpetersäure gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet werden kann. Man löst sodann die Kristalle vorsichtig in heißem Wasser und übersättigt mit Ammoniak, wobei man einen dichten, weißen, amorphen Niederschlag von Guanin erhält, den man eine Zeit auf dem Wasserbade digeriert und dann filtriert. Durch Auflösen in Natronlauge und Wiederausfällen mit Essigsäure kann man das Guanin genügend rein erhalten. Das ammoniakalische Filtrat vom Guanin wird auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht, mit Wasser aufgenommen und

[1]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 426 (1906).



mit pikrinsaurem Natron ausgefällt. Das ausfallende Adeninpikrat soll einen Schmelzpunkt von 280° zeigen und muß nötigenfalls umkristallisiert werden durch Lösen in einer gemessenen Menge Natronlauge von bekanntem Gehalt, Filtrieren und Wiederausfällen durch Zusatz einer entsprechenden Menge Salzsäure.

Die nach der Kristallisation der Nitrate der Alloxurbasen verbleibende Flüssigkeit läßt sich bei niederer Temperatur des Wasserbades von der Salpetersäure durch wiederholtes Abdampfen annähernd befreien. Wenn die Alloxurbasen als Nitrate nicht gleich im Anfang quantitativ abgetrennt worden sind, kann an dieser Stelle Xanthin- und Hypoxanthinnitrat auskristallisieren. Nach dem Auflösen in Wasser und nach Entfernung der Phosphorsäure mit Barytwasser, des überschüssigen Baryt mit CO_2 erhält man eine Lösung, die beim Einengen Thymin und Urazil auskristallisieren läßt.

5. Spaltung der Thymusnukleinsäure mit siedender Schwefelsäure[1]).

100 *g* lufttrockenes nukleinsaures Kupfer werden mit 300 *g* konzentrierter Schwefelsäure und 600 *g* Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wird die Schwefelsäure und die Phosphorsäure durch Zusatz von heißem Barytwasser, solange noch ein Niederschlag entsteht, vollkommen ausgefällt. Das Bariumsulfat und -phosphat wird mit Wasser in einer Reibschale zu einem dünnen Brei angerührt und in einem guten Emailtopf mit Wasser dreimal sorgfältig ausgekocht. (Es ist sehr schwer, das Guanin aus diesem Niederschlag wieder herauszubekommen.) Die ablaufenden Filtrate werden auf ein handliches Volumen konzentriert, mit Schwefelsäure auf einen Gehalt von etwa 5% gebracht und einer energischen Ätherextraktion unterworfen. In das Ätherextrakt geht die Lävulinsäure und ein Teil des Thymins hinein. Sobald der Äther nichts Wesentliches mehr aufnimmt, läßt man den Äther aus der Extraktionsflüssigkeit durch mäßiges Erwärmen verdunsten und fällt aus der erkalteten Lösung die Basen mit Phosphorwolframsäure heraus. Hiebei ist zum Schluß sehr vorsichtig zu verfahren, die Fällung soll vollständig sein, aber ein Zuviel von Phosphorwolframsäure läßt auch das Thymin mit in den Niederschlag hineingehen, dessen weitere Verarbeitung es nachher stören würde. Man hört zweckmäßig mit dem Zusatz des Fällungsmittels auf, sobald der Niederschlag anfängt, seine dickflockige Beschaffenheit zu verlieren und feinpulverig wird. Niederschlag und Flüssigkeit werden durch Absaugen getrennt und der

[1]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **43.** 402 (1904/05).

Niederschlag durch wiederholtes Anreiben in der Reibschale mit 5 Volumprozent H_2SO_4-haltigem Wasser und Absaugen gewaschen.

I. Verarbeitung des Niederschlages.

In ihm sind die Alloxurbasen und das Zytosin enthalten. Man reibt den Niederschlag mit Azetonwasser zu einem dünnen Brei an, der rasch in Lösung geht. Dann setzt man portionsweise heißgesättigte Barytlösung hinzu, bis sämtliche Phosphorwolframsäure an Baryt gebunden ist. Dies zeigt sich durch einen Farbenumschlag von Blau in Gelb in der Flüssigkeit an; man erwärmt zum Schluß noch einige Zeit weiter, um die Umsetzung ganz zu vollenden; dann gibt der in der Flüssigkeit vorhandene überschüssige Baryt in einer herausgenommenen Probe einen dicken Niederschlag von $BaCO_3$ mit einer Lösung von Natriumkarbonat. Der phosphorwolframsaure Baryt wird abgesaugt und dreimal mit heißem Wasser angerieben und ausgekocht, aus den eingeengten Filtraten der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure vorsichtig unter Vermeidung eines Überschusses entfernt, dann mit Salpetersäure schwach sauer gemacht und mit einer 20%igen Silbernitratlösung eine Fällung der Alloxurbasen erzeugt.

a) *Fällung der Alloxurbasen*[1]).

Die Fällung wird auf einem Faltenfilter gesammelt und, sobald der größte Teil der Flüssigkeit abgelaufen ist, auf der Saugpumpe scharf abgesaugt und mit silbernitrathaltigem Wasser gewaschen. Man bringt dann den Niederschlag in stark ammoniakhaltiges Wasser und digeriert ihn hiemit einige Zeit in der Wärme. Dabei gehen die Silbernitratverbindungen der Alloxurbasen in die Silberverbindungen über; sie werden abgesaugt und so lange mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen, bis sie salpetersäurefrei sind. Dies ist sehr wichtig, weil die Salpetersäure sonst leicht die weitere Verarbeitung stören kann. Der Filterrückstand wird nunmehr in siedendem Wasser fein verteilt, durch Zusatz von Salzsäure das Silber ausgefällt und die Basen in ihre Chloride verwandelt, das Chlorsilber abgesaugt und das Filtrat auf dem Wasserbade vorsichtig zur Trockne gebracht, zum Schluß bei niederer Temperatur und unter häufigem Umschwenken der Schale. Die Masse wird nun mit Wasser siedend heiß gelöst und in der Wärme mit 10%igem Ammoniak im Überschuß versetzt[2]). Der sofort entstehende Niederschlag von Guanin wird nach 24stündigem Stehen abfiltriert, noch einmal mit 2%igem Ammoniak in der Wärme digeriert, wiederum abfiltriert und endlich zur Reinigung in verdünnter

[1]) *Krüger* und *Salomon*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 373 (1898/99).
[2]) *Krüger* und *Schittenhelm*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**. 153 (1902).

Natronlauge gelöst und durch Ansäuern der alkalischen Lösung mit Essigsäure wieder ausgefällt. Zur Identifizierung kann das Guanin in das in langen Nadeln kristallisierende Sulfat übergeführt werden.

Die ammoniakalischen Filtrate vom Guanin werden zur Trockne gebracht, nach Entfernung des Ammoniaks mit schwach salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen und mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat so lange versetzt, als noch ein weiterer Zusatz des Fällungsmittels zu einem Teile des Filtrates sofort eine Fällung erzeugt. Der Niederschlag von pikrinsaurem Adenin wird sofort mit Hilfe einer Saugvorrichtung abfiltriert. Zur Reinigung wird das Adeninpikrat in heißem Wasser unter Zusatz der berechneten Menge Normalnatronlauge gelöst, dann die der Lauge entsprechende Menge an Normalsalzsäure hinzugefügt und diese Lösung mit Tierkohle behandelt. Aus dem Filtrate scheidet sich dann das Adeninpikrat in langen, glänzenden Nadeln ab. F. P. 281°.

Der Rest der neben Guanin und Adenin vorhandenen Basen wird aus dem ammoniakalisch gemachten Filtrate vom Adeninpikrat durch ammoniakalische Silberlösung ausgefällt. Der gut mit ammoniakalischem Wasser salpetersäurefrei gewaschene Niederschlag wird mit Salzsäure zersetzt, das Chlorsilber entfernt, die Lösung der Chloride vorsichtig zur Trockne gebracht und die überschüssige Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser unter häufigem Umschwenken der Schale und zum Schluß bei niederer Temperatur entfernt. Digeriert man nun den Rückstand mit Wasser bei 40°, so geht das Hypoxanthinchlorid völlig in Lösung, während das Xanthin größtenteils ungelöst zurückbleibt. Zur Identifizierung wird es in das schwer lösliche Nitrat verwandelt. Das Hypoxanthin wird mit Hilfe seines pikrinsauren Salzes gereinigt und dann in das Nitrat verwandelt.

b) *Zytosinfällung.*

Die von den Silbernitratverbindungen der Alloxurbasen abgelaufene Flüssigkeit enthält das Zytosin[1]); man erhält es in Form seiner Silberverbindung, wenn man die schwach saure Flüssigkeit so lange mit weiteren Mengen von Silbernitratlösung versetzt, bis eine herausgenommene Probe, in Barytwasser hineingetropft, nicht mehr einen weißen, sondern einen schwarzbraunen Niederschlag von Silberoxyd ausfallen läßt. Ist dieser Punkt erreicht, so wird die Flüssigkeit so lange mit Barytwasser versetzt, bis sie gegen Phenolphthalein anfängt alkalisch zu reagieren. Den Niederschlag saugt man ab, wäscht ihn gründlich mit schwachem Baryt-

[1]) *Kutscher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **38.** 170 (1903).

wasser aus, zersetzt ihn mit Salzsäure, bringt etwa vorhandenes Barium im Filtrat durch Schwefelsäure zur Ausscheidung und fällt das Zytosin mit Platinchlorid oder Natriumpikrat aus. Letzteres wird wie das Adenin umkristallisiert. Andere Körper sind in dieser Fraktion nicht enthalten, das vom Zytosinsilber ablaufende Filtrat enthält keine mit Phosphorwolframsäure fällbaren Basen mehr.

II. Verarbeitung des Filtrates von der Phosphorwolframsäurefällung.

Die überschüssige Phosphorwolframsäure und die Schwefelsäure werden wie im Anfang mit Baryt entfernt, der Niederschlag quantitativ ausgekocht, aus dem Filtrat das Barium quantitativ mit Schwefelsäure niedergeschlagen und die Lösung eingeengt. Es kristallisiert das Thymin aus, das aus Alkohol umkristallisiert werden kann. Die letzten Fraktionen der Kristallisationen enthalten das Urazil; seine Gewinnung in reinem Zustande ist sehr umständlich und mit großen Verlusten verbunden. Eine Methode, Thymin und Urazil besser zu trennen, ist von *T. B. Johnson*[1]) angegeben.

Will man nur einzelne der Spaltungsprodukte aus der Zersetzungsflüssigkeit isolieren, so lassen sich die obigen Vorschriften zweckmäßig abändern. Will man die Alloxurbasen allein haben, so lassen sie sich aus der ammoniakalisch gemachten Zersetzungsflüssigkeit, die durch Kochen mit Mineralsäuren erhalten wurde, mit ammoniakalischer Silberlösung ausfällen, viel leichter und bequemer aber erhält man sie durch Spaltung der Nukleinsäure mit Salpetersäure; will man Thymin und Zytosin haben, so ist es zweckmäßig, die Alloxurbasen durch Spaltung mit Schwefelsäure unter Druck zu zerstören, dann die Schwefelsäure und die Phosphorsäure mit Baryt herauszuschaffen und aus der nachher mit Salpetersäure schwach angesäuerten Flüssigkeit Thymin und Zytosin mit Silber und Baryt zu fällen nach der oben beschriebenen Methode. Das Zytosin kann man eventuell aus schwach 3- bis 4 %iger schwefelsaurer Lösung mit Quecksilbersulfat fällen[2]).

6. Nachweis der Bausteine der Thymusnukleinsäure.

1. Guanin. Entweder als freie Base, $C_5H_5N_5O$, MG. = = 151·09, C = 39·71 %, H = 3·33 %, N = 46·36 %; oder besser als Sulfat: $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + 2H_2O$, MG. = 436·29, H_2O = = 8·26 % (bei 140° getrocknet). H_2SO_4 = 22·48 %, N = 32·11 %.

[1]) *T. B. Johnson*: Journ. biol. chem. **4**. 407 (1908).

[2]) *Kossel* und *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 49 (1903).

Auf kristallwasserfreies Salz berechnet: $(C_5 H_5 N_5 O)_2 H_2 SO_4$, MG. = 400·26, C = 29·98%, H = 3·02%, N = 35·00%, $H_2 SO_4$ = = 24·50%.

Das Guaninsulfat zersetzt sich mit Wasser in freies Guanin und in Schwefelsäure, die noch etwas Guanin gelöst hält. Gibt in sodaalkalischer Lösung mit einer Lösung frisch bereiteter Diazobenzolsulfosäure intensive Rotfärbung[1]).

Darstellung der Diazobenzolsulfosäure[2]):

2 *g* feingepulverte Sulfanilsäure werden mit 3 cm^3 Wasser und 2 cm^3 konzentrierter Salzsäure zu einem Brei geschüttelt und in kleinen Portionen innerhalb einer Minute mit einer Lösung von 1 *g* frischem Kaliumnitrit in 1 bis 2 cm^3 Wasser versetzt, wobei nach jedem Zusatz mit kaltem Wasser gekühlt wird. Die Sulfanilsäure geht größtenteils rasch in Lösung und an ihre Stelle tritt alsbald ein dichter, weißer, kristallinischer Niederschlag von Diazobenzolsulfosäure, der nach einigen Minuten abgesaugt und mit wenig Wasser ausgewaschen wird. Unveränderte Sulfanilsäure beeinträchtigt die Reaktion nicht.

Die *Weidel*sche Probe fällt beim Guanin negativ aus.

*Weidel*sche Probe: Man löst ein wenig Substanz in frisch bereitetem Chlorwasser in der Wärme in einer Porzellanschale, dampft die Lösung im Wasserbade zur Trockne und setzt den weißen oder schwach gelben Rückstand unter einer Glocke einer Ammoniakatmosphäre aus. Bei positivem Ausfall dunkelrosarote bis purpurrote Färbung, die in zweifelhaften Fällen durch leichtes Anwärmen und Betupfen mit wenig Ammoniak deutlicher gemacht werden kann. Zusatz von Natron- oder Kalilauge (in der Wärme) gibt eine blauviolette Farbe. (Die Probe ist eine Murexidprobe; siehe dazu S. 57.)

Die Xanthinprobe mit Salpetersäure fällt positiv aus.

Xanthinprobe: Eine kleine Menge Substanz wird in wenig Salpetersäure 1·12 spezifisches Gewicht heiß gelöst in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Es hinterbleibt bei positivem Ausfall der Probe ein zitronengelber Fleck, der sich in Kali- oder Natronlauge mit etwas dunklerer gelber Farbe löst und beim Erwärmen sich violettrot färbt und einen purpurroten Rückstand hinterläßt. Bei längerem Trocknen auf dem Wasserbade färbt sich der beim Abdampfen der Salpetersäure erhaltene gelbe Rückstand meist rötlich, sobald die zu untersuchende Substanz auch nur Spuren von Chlor oder eines Chlorides

[1]) *Burian*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**. 698 (1904).

[2]) *Pauly*: Zeitschr f physiol. Chem. **42**. 516 (1904).

enthielt[1]), Ammoniak liefert dann beim Befeuchten eine dunkelrosenrote bis purpurne Färbung, Kalilauge eine blauviolette Farbe (Murexidprobe, siehe dazu S. 57).

Unter dem Mikroskop zeigt das salzsaure Guanin vierseitige, schlanke Säulen, die Auslöschungsrichtung bildet mit den Kanten in den meisten Fällen einen Winkel von 27°, bei einzelnen beobachtet man auch einen solchen von 30°.

Guaninpikrat. F. P. = 255 bis 260°.

2. Adenin: Pikrat: $C_5 H_5 N_5 . C_6 H_3 N_3 O_7$, MG. = 364·14, Schmelzpunkt 280° (unkorr.). C = 36·25%, H = 2·21%, N = = 30·78%.

Fällt beim Umkristallisieren kristallwasserfrei in makroskopischen Prismen aus. Löslichkeit in Wasser 1: 3500 bei Zimmertemperatur.

Sulfat: $(C_5 H_5 N_5)_2 H_2 SO_4 + 2 H_2 O$, MG. = 404·29, $H_2 O$ = = 8·91% (bei 110° getrocknet), N = 34·65%, $H_2 SO_4$ = 24·26%. Löslichkeit in Wasser 1: 153 bei Zimmertemperatur. Zersetzt sich nicht beim Umkristallisieren.

Das wasserfreie Salz $(C_5 H_5 N_5)_2 H_2 SO_4$, MG. = 368·26, verlangt: C = 32·59%, H = 3·28%, N = 38·04%, $H_2 SO_4$ = 26·63%.

Zur Erkennung kleiner Adeninmengen eignet sich das Salz mit Goldchlorid, das unter dem Mikroskop charakteristische Formen zeigt. Die Auslöschungen liegen bei den Skelettformen sowie bei den prismatischen Gestalten parallel der Längsrichtung. Die Kristalle des salzsauren Salzes sind derbe Prismen, die oft einen Winkel von 137° zeigen.

Das Adenin gibt in sodaalkalischer Lösung keine Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure[2]), *Weidel*sche Reaktion und Xanthinprobe fallen negativ aus.

Zur Isolierung von Adenin aus Adeninpikrat eignet sich folgendes Verfahren[3]): Eine Lösung von Adeninpikrat in 10% NH_3 wird mit einer ammoniakalischen Chlorsilberlösung behandelt, der gebildete gelatinöse Niederschlag abfiltriert, in heißem Wasser suspendiert, mit Salzsäure zersetzt und die blaßgelbe Lösung vom Chlorsilber abfiltriert. Man schüttelt die salzsaure Lösung mit etwas Äther aus, neutralisiert sie mit Na OH, fällt das Adenin mit $Cu SO_4$ und $Na H SO_4$ aus, zersetzt die Cu-Verbindung mit Schwefelwasserstoff, filtriert, dampft das Filtrat ein und kristallisiert aus heißer 5%iger $H_2 SO_4$ um.

---

[1]) *Stadthagen*: *Virchows* Arch. **109**. 395.

[2]) *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 428 (1906).

[3]) *Barnett* und *Jones*: Journ. biol. chem. **9**. 93 (1911).



3. Xanthin wird identifiziert am besten als freie Base. Es fällt entweder amorph wasserfrei aus oder kristallisiert mit 1 Mol. Kristallwasser, das es bei 125 bis 130° abgibt. Löslich in 13.000 bis 14.000 Teilen kaltem, in 1300 bis 1400 Teilen heißem Wasser, schwer löslich in Alkohol, leicht löslich im Überschuß von Ammoniak und Alkalihydrat.

$C_5H_4N_4O_2$, MG. = 152·07, l. M. = 18.204, 39·46 % C, 2·65 % H, 36·85 % N.

Es gibt die Xanthin- und die *Weidel*sche Probe.

4. Hypoxanthin erkennt man ebenfalls am besten als freie Base, farblose, mikroskopische Kristalle, löslich in etwa 1400 Teilen kalten, in 70 Teilen heißen Wassers, fast unlöslich in Alkohol, leicht löslich in verdünnten Säuren und Laugen.

$C_5H_4N_4O$, MG. = 136·07, 44·09 % C, 2·96 % H, 41·19 % N; oder als in Salpetersäure schwerlösliches Nitrat:

$$C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O.$$

Gibt sein Kristallwasser bei 105° ab. 8·29 % H_2O.

Bei 120° gibt das Salz schon Salpetersäure ab.

$C_5H_4N_4O \cdot HNO_3$, MG. = 199·09, 30·14 % C, 2·53 % H, 35·18 % N.

Das Hypoxanthin gibt weder die *Weidel*sche noch die Xanthinprobe.

Stellt man die Reaktionen der einzelnen Basen der Xanthin- (X) und der *Weidel*schen (W) Probe gegenüber zusammen, so erhält man folgendes Bild:

	W	X
Guanin	W o	X +
Adenin	W o	X o
Xanthin	W +	X +
Hypoxanthin	W o	X o
Harnsäure	W +	X +
Zytosin	W +	X +
Urazil	W +	X +
Thymin	W o	X o

Aber eine Unterscheidung der einzelnen Purinkörper nach diesem Schema und etwa gar nach dem Ausfall der Farbennuancen bei Übersättigung mit Alkali oder NH_3 ist gänzlich problematisch, es wäre am besten, für die beiden Proben die gemeinsame Bezeichnung „Murexidprobe" einzuführen. (Siehe dazu auch *E. Fischer*[1]).

[1]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2236 (1897).

Man führt die Probe am besten so aus, daß man wenige Körnchen der zu untersuchenden Substanz mit frisch bereitetem Chlorwasser oder Salzsäure und etwas Kaliumchlorat in einem kleinen Porzellanschälchen bis zum gelinden Sieden über einer kleinen Flamme erwärmt und darin auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Eine zweite Substanzmenge behandelt man in gleicher Weise mit Salpetersäure von 1·12 spezifischem Gewicht. Den eventuell gelblich gefärbten Rückstand betupft man wit wenig Ammoniak und erwärmt noch einmal wieder gelinde. In manchen Fällen kommt dann die purpurrote Färbung rascher zum Vorschein- Eine andere Stelle des Rückstandes prüft man mit Natronlauge oder Kalilauge.

5. Zytosin wird identifiziert entweder als Platinchlorhydrat: $(C_4H_5ON_3)_2PtCl_4 2HCl$, MG. = 631·6, C = 15·19 %, H = 1·90 %, N = 13·31 %, Pt = 30·84 %, Cl = 33·68 %; oder als Pikrat:

$C_4H_5ON_3 . C_6H_3O_7N_3$, MG. = 340·12, C = 35·26 %, H = 2·37 %, N = 24·75 %.

Hellgelbe, glänzende Nadeln, die bei 255° sich bräunen und bei 270° (unkorr.) unter Zersetzung schmelzen.

Das Zytosin gibt die *Weidel*sche Probe.

Das Platindoppelsalz des Zytosins zeigt doppeltbrechende Zwillingsformen, die so aneinander gelagert sind, daß die Auslöschungsrichtung in dem einen Kristall einen Winkel von 53° mit der Auslöschungsrichtung des anderen Kristalles bildet[1]).

6. Thymin: Die Identifizierung des Thymins kann nur durch die Elementaranalyse geschehen. Erleichtert wird die Erkennung der Substanz durch seine Sublimationsfähigkeit und durch den charakteristischen Winkel[1]) seiner Kristalle (60°).

$C_5H_6N_2O_2$, MG. = 126·07, C = 77·60 %, H = 4·80 %, N = = 22·22 %.

Löslichkeit in Wasser bei Zimmertemperatur 1 : 350 H_2O, in heißem Wasser und heißem Alkohol leicht löslich.

7. Das Urazil läßt sich gleichfalls nur durch die Elementaranalyse erkennen.

Es gibt die *Weidel*sche Probe und kristallisiert häufig in kreidig aussehenden Scheiben, die aus konzentrisch angeordneten Nädelchen bestehen.

$C_4H_4O_2N_2$, MG. = 112·05, C = 42·82 %, H = 3·59 %, N = = 25·05 %.

---

[1]) *Kossel* und *Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. 37. 379 (1902/03).



8. Die Lävulinsäure kann als Silbersalz bestimmt werden. $C_5 H_7 O_3 Ag$ — charakteristischer, kristallinischer Niederschlag, aus Wasser in Blättchen, löslich in 150 Teilen Wasser bei 17° C = 26·91 %, H = 3·14 %, Ag = 48·43 %, oder als Hydrazon durch Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin zur Lösung von Lävulinsäure, $C_{11} H_{14} N_2 O_2$, C = 64·07 %, H = 6·79 %, N = = 13·59 %, F. P. = 108°.

Die Kristalle zersetzen sich schon beim Aufbewahren im Exsikkator.

9. Reaktionen des Kohlenhydrates der Thymusnukleinsäure[1]). 0·2 *g* nukleinsaures Natrium werden im Reagenzglase in 2 cm^3 Wasser im Wasserbade gelöst, zu der heißen Lösung 1 cm^3 2 n-Schwefelsäure zugegeben und das Glas unter öfterem Umschütteln 3 Minuten im siedenden Wasserbade belassen. In dieser Zeit löst sich die anfangs ausgefallene Nukleinsäure vollständig auf. Dann kühlt man unter der Wasserleitung ab und neutralisiert genau mit 2 n-Natronlauge, wobei eine Trübung von ausfallendem Guanin aufzutreten pflegt.

α) *Aldehydreaktion.*

Zu einigen Kubikzentimetern fuchsinschwefeliger Säure[2]) gibt man einen Tropfen der Hydrolysenflüssigkeit: Intensive Violettfärbung nach wenigen Augenblicken. Die Reaktion ist äußerst empfindlich; ein einziger Tropfen einer 1 %igen Lösung von reinem thyminsauren Barium gibt die Reaktion noch deutlich. Versetzt man einige Kubikzentimeter ammoniakalischer Silberlösung mit einigen Tropfen der Flüssigkeit, so tritt nach einiger Zeit Reduktion ein. Es bildet sich aber kein oder nur ein sehr unvollkommener Silberspiegel, sondern das reduzierte Silber bleibt kolloidal in Lösung, daher intensive Braunfärbung. Ein weiterer Beweis für die Aldehydnatur der freigewordenen reduzierenden Gruppen bildet die Eigentümlichkeit des thyminsauren Bariums, mit Phenylhydrazin Verbindungen einzugehen, in denen auf je ein Kohlenhydrat 1 Mol. Phenylhydrazin kommt und die infolgedessen den Charakter der Hydrazone, nicht der Osazone tragen.

β) *Die Fichtenspanreaktion.*

Ein Fichtenspan wird unter Erwärmen gut mit der Hydrolysenflüssigkeit getränkt und sodann in einem Reagenzglase Salzsäuredämpfen ausgesetzt, die durch Erhitzen von etwas konzentrierter Salzsäure in der Kuppe des Reagenzglases erzeugt werden: Der Stab nimmt eine schöne tiefgrüne Farbe an.

---

[1]) *Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**. 247 (1917).

[2]) Eine 0·5 %ige Lösung von Fuchsin wird mit SO_2 entfärbt, und das überschüssige SO_2 im Vakuum entfernt.

7. Spaltung der Guanylsäure mit Schwefelsäure[1]).

10 *g* Guanylsäure werden mit 500 *cm*³ 5%iger Schwefelsäure 3 Stunden lang im siedenden Wasserbad erwärmt. Beim Abkühlen scheidet sich Guaninsulfat in langen Nadeln aus. Die Reaktionsflüssigkeit wird dann einer energischen Ätherextraktion in dem von *Kutscher* und *Steudel* beschriebenen Apparate unterworfen. In das Ätherextrakt geht Furfurol über. Nach der Extraktion mit Äther wird die Zersetzungsflüssigkeit mit Natronlauge genau neutralisiert, worauf sich fast sämtliches Guanin als amorpher, flockiger Niederschlag ausscheidet.

Das Filtrat vom Guanin zeigt starkes Reduktionsvermögen gegen *Fehling*sche Lösung. Aus ihm läßt sich nach Entfernung des Guanins mit Silbersulfat mit Hilfe von p-Bromphenylhydrazin das Osazon der d-Ribose[2]) darstellen.

Das Osazon sintert bei 177°, schmilzt bei 180°.

Die Ribose kann auch nach *v. Braun*[3]) mit Hilfe von Diphenylmethandimethylhydrazin nachgewiesen werden. d-Ribose gibt mit dem Hydrazin in essigsaurer Lösung das Hydrazon $(C_5H_{10}O_4 : N . N [CH_3] . C_6H_4)_2 CH_2$ Kristallpulver aus Alkohol, F. P. = 141 bis 142°, leitet löslich in Wasser. d-Lyxose liefert unter den gleichen Bedingungen ein feinkristallinisches Hydrazon vom F. P. 156°, das in warmem Alkohol bedeutend weniger löslich ist als die Riboseverbindung.

8. Spaltung der Inosinsäure.

Die Methode der Spaltung der Inosinsäure ist die gleiche wie bei der Spaltung der Guanylsäure. Will man Spaltstücke haben, die noch zu je zwei einfachen Bausteinen zusammenhängen, so wendet man in den vorstehenden Fällen zweckmäßig die neutrale Hydrolyse an. Die Methode findet sich beim partiellen Abbau der Nukleinsäuren beschrieben.

9. Abbau der Nukleinsäuren durch Fermente.

Die Methodik des Abbaues der Nukleinsäuren durch Fermente schließt sich durchaus der sonst beim Studium der Fermente üblichen an. Es wird ein Wasserextrakt des zu untersuchenden Organs hergestellt und aus ihm eventuell durch Fällung mit Ammonsulfat usw. ein fermentativ wirksamer Niederschlag gewonnen, der

---

[1]) *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**. 541 (1907).
[2]) *Levene* und *Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 2703 (1909).
[3]) *J. v. Braun*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 3949 (1913).

nun in Wasser gelöst und zu dem die zu prüfende Substanz hinzugesetzt wird. Da bei der Selbstverdauung der Thymusdrüse[1]), der Hefe[1]) und des Pankreas[1]) die Zersetzungsprodukte der Nukleinsäure aufgefunden worden sind, so müssen selbstverständlich Fermente existieren, die die Nukleinsäure abbauen — N u k l e a s e n. So läßt sich aus dem Pankreas neben dem Trypsin nach *Sachs*[2]) eine Nuklease extrahieren, die ebenfalls in der Thymusdrüse, in der Darmschleimhaut[3]), in der Hefe, in Schimmelpilzen[4]) und in vielen anderen Mikroorganismen[5]) vorhanden ist. Reines Trypsin[6]) und reines Erepsin[7]) sind gänzlich wirkungslos auf Nukleinsäure. Um wirksame Lösungen zu erhalten, wird das fein zerhackte Organ, z. B. Pankreas, mit Sand verrieben, mit der Handpresse ausgepreßt, der ausgepreßte Saft mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt und filtriert.

Solche Extrakte verwandeln zunächst die gelatinierende Nukleinsäure in die nicht gelatinierende Form und sehr bald lassen sich abgespaltene Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung, Phosphorsäure mit Magnesiamixtur nachweisen. Das Reduktionsvermögen solcher Extrakte gegen *Fehling*sche Lösung (nach Entfernung der Alloxurbasen) nimmt stark zu[8]). Die fortschreitende Aufspaltung läßt sich auch durch fortlaufende Bestimmung des optischen Drehungsvermögens verfolgen[9]).

Ebenso wie die Thymonukleinsäure unterliegen auch die Hefenukleinsäure und die einfachen Nukleinsäuren[10]), Guanylsäure und Inosinsäure, fermentativen Spaltungen. Auch hier läßt man wässerige Organextrakte auf die betreffenden Substanzen wirken und bestimmt dann nach den üblichen Methoden die entstandenen Spaltprodukte.

---

[1]) *F. Kutscher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 59 (1901); **34**. 114 (1901/02); **25**. 195 (1898); **26**. 110 (1898/99); **28**. 88 (1899).

[2]) *F. Sachs*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 337 (1905).

[3]) *T. Araki*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 84 (1903).

[4]) *L. Iwanoff*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 31 (1903).

[5]) *H. Plenge*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 190 (1903); *A. Schittenhelm* und *F. Schrötter*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 203 (1903); **40**. 62 (1903/04); **40**. 70 (1903/04); **41**. 284 (1904).

[6]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 452 (1906); *H. Steudel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**. 408 (1908).

[7]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 452 (1906); *M. Nakayama*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**. 348 (1904).

[8]) *P. de la Blanchardiere*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 291 (1913).

[9]) *Levene* und *Medigreceanu*: Journ. biol. chem. **9**. 65, 389 (1911); *Amberg* und *Jones*: Journ. biol. chem. **10**. 8 (1911/12).

[10]) *Juschtschenko*: Biochem. Zeitschr. **31**. 377 (1911).

Da die Organextrakte viele verschiedene Fermente enthalten, so ist natürlich eine weitere Einwirkung anderer Fermente auf primär entstandene Spaltstücke möglich[1]), z. B. kann primär abgespaltenes Guanin fermentativ in Xanthin übergeführt werden. Derartige sekundäre Einwirkungen müssen bei der Beurteilung fermentativer Spaltungsergebnisse immer im Auge behalten werden.

Die Wirksamkeit der Nuklease läßt sich auch mit dem *Ostwald*-schen Viskosimeter kontrollieren[2]).

---

[1]) *Jones*: Journ. biol. chem. **9**. 129; *Neuberg*: Biochem. Zeitschr. **30**. 505 (1911). *Pighini*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 85 (1910/11).

[2]) *P. de la Blanchardière*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 291 (1913).

Abbau der Nukleinsäuren.

A. Teilweiser Abbau und Isolierung der Spaltstücke.

Von **Thannhauser**, München.

In der Forschung der Nukleinsäurechemie lassen sich 3 Perioden unterscheiden. Zuerst ging man darauf aus durch totale Hydrolyse der Nukleinsäuren die kleinen Spaltstücke des großen Moleküls zu isolieren und sie mit den inzwischen durch Synthese erhaltenen Körpern der gleichen Gruppe zu identifizieren. Aus den Mengenverhältnissen, in denen die einzelnen Bruchstücke im Hydrolysengemisch auftraten, suchte man Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des großen Moleküls zu ziehen.

Durch mineralsaure Hydrolyse der tierischen und pflanzlichen Nukleinsäuren wird das große Molekül in seine einzelnen Bausteine aufgespalten. Aus dem sauren Hydrolysengemisch isolierten *Kossel* und seine Schüler die Purine „Adenin, Guanin, Xanthin und Hypoxanthin" und die Pyrimidine „Thymin, Zytosin und Urazil". *Steudel* konnte zeigen, daß nur die Aminopurine Adenin und Guanin im Molekül der Nukleinsäure vorgebildet sind, und daß Hypoxanthin und Xanthin erst sekundär bei der Hydrolyse entstehen. Außer den Purinen und Pyrimidinen wurde in dem Gemisch der tiefgreifenden, mineralsauren Hydrolyse Phosphorsäure gefunden und noch 2 Körper, die Lavulinsäure und die Epizuckersäure isoliert, welche darauf schließen ließen, daß im Molekül der Nukleinsäure auch Kohlehydratgruppen vorhanden sind.

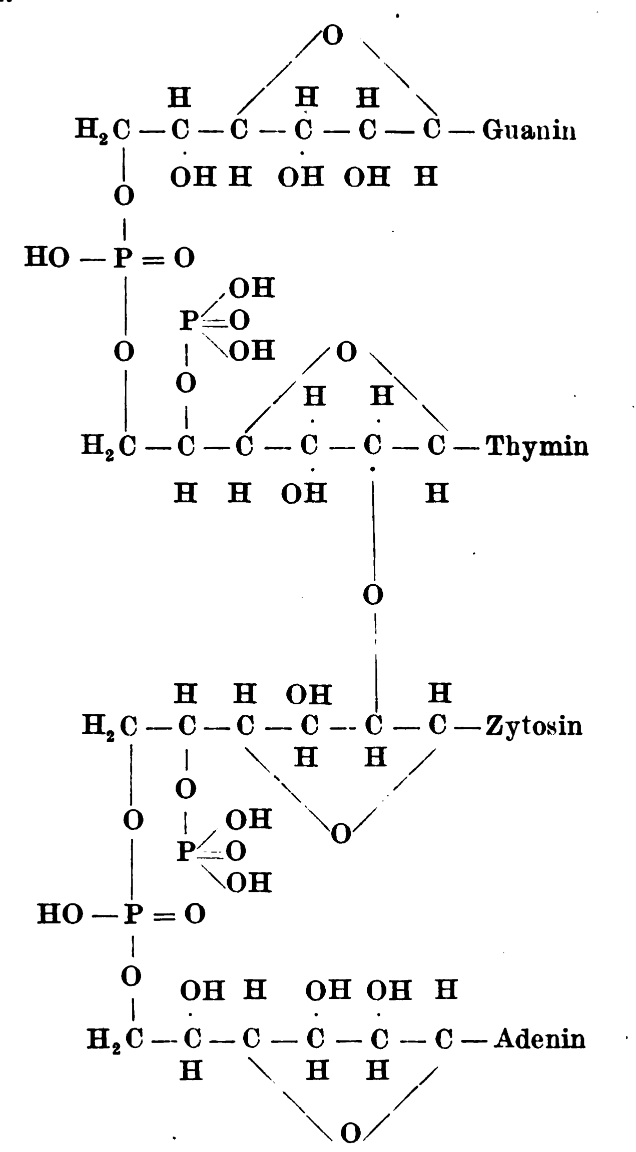
Die zweite Periode umfaßt die Arbeiten, welche zu erforschen suchten, auf welche Weise die einzelnen kleinen Spaltstücke im Molekül der Nukleinsäure miteinander verbunden sind. Zuerst war man geneigt, die Phosphorsäure als bindendes Mittelglied zwischen Purin und Kohlehydrat anzunehmen, bis *Levene* und *Jacobs* durch partielle Hydrolyse der Nukleinsäuren Körper isolierten, welche die Kohlehydratgruppe einerseits in direkter Verkettung mit den Purinen und Pyrimidinen enthielten, andererseits das Kohlehydrat in Esterbindung mit der Phosphorsäure zeigten. Die Purinkohlehydratverbindungen nannte *Levene* „Nukleoside", da das Kohlehydrat in glykosidartiger Verkettung am Purin haftet.

Der Ort, an welchem die Glykosidbindung am Purinkern haftet, ist noch zweifelhaft. Man nimmt gewöhnlich an, daß das Glykosid in 7-Stellung am Stickstoff sitzt. Da jedoch die Purine, wie *H. Fischer* nachwies, in 8-Stellung Azofarbstoffe mit Diazobenzolsulfosäure bilden, besteht auch die Möglichkeit, daß der Zucker in 8-Stellung am Kohlenstoff gebunden ist. Die leichte Spaltbarkeit der Nukleoside spricht allerdings gegen eine Bindung am 8. Kohlenstoff des Purinkernes. *Levene* und *Jacobs* stellten die Nukleoside „Adenosin und Guanosin" und die Pyrimidinzuckerverbindungen „Zytosin und Urazil" aus der Hefenukleinsäure als reine kristallisierte Körper dar. Den Kohlehydratphosphorsäureester, welchen diese Forscher ebenfalls durch partielle Aufspaltung der Hefenukleinsäure isolierten, konnten sie als den Phosphorsäureester der d-Ribose identifizieren. Somit war im Prinzip die Verkettung der kleinen Bausteine im Nukleinsäuremolekül geklärt. Die Kohlehydratgruppe ist am alkoholischen Hydroxyl mit der Phosphorsäure verestert und mit der Aldehydgruppe unter γ-Laktonbindung glykosidartig an das Purin oder Pyrimidin gebunden. Einen solchen Komplex von Phosphorsäurekohlehydratpurin oder -pyrimidin nannte *Levene* „Nukleotid". Enthält eine Nukleinsäure nur einen derartigen Nukleotidkomplex, so wird sie als Mononukleotid bezeichnet. Setzt sich eine Nukleinsäure aus mehreren Nukleotidkomplexen zusammen, so wird sie „Polynukleotid" benannt. Die Inosinsäure, welche nur Hypoxanthin, Kohlehydrat, Phosphorsäure enthält, ist ein Mononukleotid. Die Thymusnukleinsäure oder die Hefenukleinsäure, welche mehrere derartige Komplexe enthalten, sind Polynukleotide. Den Aufbau der Polynukleotide aus den Mononukleotiden bewerkstelligt nach *Levene* die Phosphorsäure, indem sie durch die Anhydrisierung ihrer sauren Hydroxyle mehrere Mononukleotide verkettet. Für die Hefenukleinsäure nimmt *Levene* folgenden Aufbau an.

OH
$O{=}P - 0 . C_5 H_3 O_5 - C_5 H_4 N_5$ Adenylsäurerest
O
$O{=}P - 0 . C_5 H_8 O_5 - C_5 H_8 N_5 0$ Guanylsäurerest
O
$O{=}P - 0 . C_5 H_8 O_5 - C_4 H_4 N_3 0$ Cytidinphosphorsäurerest
O
$O{=}P - 0 . C_5 H_8 O_5 - C_4 H_3 N_2 0_2$ Uridinphosphorsäurerest
OH

Auch in der tierischen Nukleinsäure sollen die einzelnen Mononukleotide in gleicher Weise zusammengehalten werden, nur enthält das tierische Polynukleotid keine Pentose, sondern eine Hexose, und es tritt an Stelle der Uridinphosphorsäure das Thymidin-

nukleotid. In einer späteren Arbeit ändern *Levene* und *Jacobs* ihre ursprüngliche Auffassung über den Aufbau der tierischen Nukleinsäure und stellen für die Thymusnukleinsäure folgende Formel auf.



In der dritten Periode der Nukleinsäureforschung, d. h. in den letzten Jahren ging man darauf aus, größere Komplexe als die Nukleoside aus den Polynukleotiden zu isolieren und womöglich die Polynukleotidkomplexe in die einzelnen Mononukleotide auf-

zuspalten, um auf diese Weise Einblick in die Struktur des großen Nukleinsäuremoleküls zu gewinnen. Wenn im Polynukleotidkomplex die einzelnen Mononukleotide wirklich nur durch die Phosphorsäureanhydridbindungen zusammengehalten werden, so mußte es gelingen, durch milde Hydrolyse die Anhydridbindungen zu lösen, ohne eine tiefere Aufspaltung der Nukleotid- und Phosphorsäureesterbindung zu bewirken. Derartige Versuche führten aber nicht zur erwarteten Aufspaltung in die einzelnen Mononukleotide, sondern *Thannhauser* und *Dorfmüller* erhielten durch milde ammoniakalische Hydrolyse der Hefenukleinsäure ein Trinukleotid, das sie „Triphosphonukleinsäure" nannten, und nur ein Mononukleotid, die „Uridinphosphorsäure". Beide Substanzen wurden als kristallisierte Bruzinsalze gewonnen. Da die Analysen dieser Körper zeigten, daß die Triphosphonukleinsäure mit 6 Molekülen Bruzin und die Uridinphosphorsäure mit 2 Molekülen Bruzin kristallisiert, mußte man annehmen, daß alle Phosphorsäureanhydridbindungen durch die milde Hydrolyse gelöst worden sind und dadurch zur Salzbildung befähigt sind. Das Bestehenbleiben eines Trinukleotides nach Lösung aller Phosphorsäureanhydridbindungen führte die Untersucher in der Annahme, daß die in der Triphiphonukleinsäure enthaltenen 3 Mononukleotide noch durch eine intermolekulare Verkettung zusammengehalten werden. *Thannhauser* und *Dorfmüller* stellten daher für die Hefenukleinsäure eine Formel auf, in der die Uridinphosphorsäure nur durch die Phosphorsäureanhydridbindung fixiert ist, während die in der Triphosphornukleinsäure enthaltenen Mononukleotide außer der Phosphorsäureanhydridbindung noch durch eine intermolekulare Bindung zusammengehalten werden.

```
OH\
  O=P   Kohlehydrat — Guanin   \
  O/         |                  |
  O=P   Kohlehydrat — Adenin    } Triphosphonukleinsäure
  O\         |                  |
  O=P   Kohlehydrat — Zytosin  /
  O/
  O=P   Kohlehydrat — Urazil     Uridinphosphorsäure
  O\
  O=P   Kohlehydrat — Guanin   \
  O/         |                  |
  O=P   Kohlehydrat — Adenin    } Triphosphonukleinsäure
  O/         |                  |
  O=P   Kohlehydrat — Zytosin  /
OH/
```

Diese Formel eines Polynukleotides wird von *Thannhauser* und *Dorfmüller* nur als eine Arbeitshypothese bezeichnet und soll Veranlassung geben, über die Art der intermolekularen Verkettung der Mononukleotide experimentell zugängliche Fragestellungen zu zeitigen. Eine ätherartige Verbindung der Mononukleotide mittels der Kohlehydratgruppen erscheint den Untersuchern bei der Triphosphonukleinsäure wahrscheinlicher als die Verkettung durch eine Kohlenstoffbindung, jedoch macht die sterische Konfiguration der d-Ribose eine Ätherformulierung schwierig.

Durch weitere partielle Hydrolyse der Triphosphonukleinsäure in pikrinsaurer Lösung erhielten *Thannhauser* und *Dorfmüller* das erste, als freie Säure kristallisierende Mononukleotid, die Zytidinphosphorsäure.

Aus der Thymusnukleinsäure konnten *Levene* und *Jacobs* durch Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure 2 Pyrimidinnukleotide als Bruzinsalze isolieren, von denen jedes im Molekül einen Pyrimidinring, eine Hexose und 2 Phosphorsäuren enthielt. Diese Körper benannten diese Forscher „Hexosethymidindiphosphorsäure„ und „Hexosezytidindiphosphorsäure„. Das von ihnen bei der gleichen Hydrolyse gewonnene Dinukleotid ist aus diesen beiden Pyrimidinnukleotiden durch Ätherbindung der beiderseitigen Kohlehydratgruppen zusammengefügt. *Levene* und *Jacobs* stellen auf Grund der Isolierung dieser Pyrimidinnukleotidkomplexe die oben angegebene Formel für die Thymusnukleinsäure auf.

1. Nukleoside.

Darstellung der Purinnukleoside **Guanosin** und **Adenosin** und der Pyrimidinnukleoside **Zytidin** und **Uridin** aus der Hefenukleinsäure[1]).

```
                                  CO—NH
    H2H  H  H  H                   |    |
      .  .  .  .                   |    |
OH . C . C . C . C . C — N — C    C . NH2     Guanosin.
      \  OH  OH  /  HC/    ||    ||
        \   O   /          ||    ||
                       N — C — N
```

```
    H2H  H  H  H        NH2 . C=N
      .  .  .  .              |    |
OH . C . C . C . C . C — N — C    CH          Adenosin.
      \  OH  OH  /  HC/    ||    ||
        \   O   /          ||    ||
                       N — C . — N
```

[1]) *P. A. Levene* und *W. Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**. 27 (1908); **42**. 335 (1909); **42**. 1198, 2102, 2469, 2474, 2703, 3247, (1909); **43**. 3142, 3151, 3162 (1910); **44**. 740, 1027 (1911); **45**. 608 (1912).

```
                          H2NC=N
      H2H H H H             |  |
OH . C . C . C . C . C ——— C  CO
       \  OH  OH /          ‖  |
        \       /          CH NH
           O
```

oder

```
                           N=C . NH2
                           |   |
                           CO  CH
      H2H H H H            |   ‖
OH . C . C . C . C . C — N — CH
       \  OH  OH /
        \       /
           O
```

} Zytidin.

```
                            CO — NH
      H2H H H H             |     |
OH . C . C . C . C . C — C     CO
       \  OH  OH /          ‖     |
        \       /           CH — NH
           O
```

oder

```
      H2H H H H
OH . C . C . C . C . C — N — CO
       \  OH  OH /          |    |
        \       /           CO   CH
           O                |    ‖
                            NH—CH
```

} Uridin.

P a r t i e l l e H y d r o l y s e d e r H e f e n u k l e i n s ä u r e. 100 *g* Hefenukleinsäure (*Böhringer*) werden in 80 cm^3 Ammoniak (spezifisches Gewicht 0·90), welches mit 420 cm^3 Wasser verdünnt wurde, aufgelöst und drei und eine halbe Stunde im Autoklaven erhitzt. Die Temperatur des Ölbades des Autoklaven muß auf 170 bis 175° C gehalten werden. Die Innentemperatur des Autoklaven soll 150° nicht übersteigen und wird am besten zwischen 135 bis 140° gehalten. Hydrolysiert man kleinere Mengen im Einschmelzrohr, so ist nur eine Temperatur von 135° im Bombenofen nötig. Der Druck, welcher bei der Hydrolyse im Autoklaven entsteht, schwankt zwischen 5 und 7 Atm. Die Lösung, welche in einer Porzellanschale oder in einem versilberten Becher im Autoklaven hydrolysiert wird, nimmt man nach der oben angegebenen Zeit, nachdem der Druck im Autoklaven gesunken ist, heraus, gießt sie in ein Becherglas und läßt sie über Nacht im Eisschrank stehen. Die Lösung erstarrt nahezu zu einer gelatinösen Masse, die sich häufig sehr schwer absaugen läßt.

Das Hydrolysengemisch läßt sich in 3 Fraktionen teilen: Die erste Fraktion enthält das Guanosin, die zweite das Adenosin und die dritte das Zytidin und Uridin.

Guanosinfraktion. Das Rohprodukt scheidet sich bereits beim Erkalten des Hydrolysengemisches als gelatinöse Masse aus. Es wird abgesaugt und ganz kurz mit möglichst wenig kaltem Wasser nachgewaschen. Man löst nun das abgesaugte Rohguanosin in wenig heißem Wasser und fällt heiß mit Bleiessig, solange ein Niederschlag entsteht. Es wird heiß von dem ausfallenden Niederschlag abfiltriert und das Filtrat abwechselnd mit Ammoniak und Bleiessig versetzt. Der nun ausfallende Niederschlag enthält das Guanosin. Diese Fällung wird abfiltriert, in heißem Wasser suspendiert, mit Hilfe von wenig Essigsäure in Lösung gebracht und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Gemisch wird aufgekocht und das heiße Filtrat vom Bleisulfid stehen gelassen, eventuell mäßig auf dem Wasserbade eingedampft. Das Guanosin scheidet sich in langen, seidenglänzenden Nädelchen aus. Kristallisiert das Guanosin nicht auf Anhieb, sondern fällt abermals als gallertige Masse aus, so wiederholt man mit der Gallerte die Fällung mit heißem Bleiessig und im Filtrat mit Bleiessigammoniak. (Sollte beim Stehen der ursprünglichen Hydrolysenflüssigkeit das Rohguanosin nicht ausfallen, so gießt man die Hydrolysenflüssigkeit in die dreifache Menge Alkohol und behandelt den entstandenen Niederschlag in der eben geschilderten Weise in wässeriger Lösung mit Bleiessig und dann mit Bleiessigammoniak.)

Adenosinfraktion. Das Filtrat von der ursprünglichen Guanosingallerte enthält das Adenosin, Zytidin und Uridin sowie Phosphorsäure und auch größere phosphorsäurehaltige Bruchstücke des Nukleinsäuremoleküls. Um die gebundene und freie Phosphorsäure zu entfernen, wird das Filtrat bei vermindertem Druck zu einer zähflüssigen Masse eingedampft, mit Ammoniakwasser deutlich alkalisch gemacht und mit 95%iger Alkohol so lange versetzt, als sich ein deutlicher Niederschlag bildet. Hiezu ist zirka 1·5 *l* Alkohol nötig. Der Niederschlag, welcher aus phosphorsäurehaltigen Bruchstücken des Moleküls besteht, wird abfiltriert und das alkoholische Filtrat auf Adenosin und die Pyrimidinnukleoside weiter verarbeitet. Die Isolierung des Adenosins geschieht mit Hilfe seines Pikrates. Die alkoholische Lösung wird bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, am besten wiederum bei vermindertem Druck, hierauf mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Lackmus versetzt und dann so lange mit gesättigter Pikrinsäurelösung behandelt, als sich ein Pikrat (Adenosinpikrat) ausscheidet. Das ausfallende Pikrat ist meist noch dunkel gefärbt und nur teilweise durchkristallisiert. Bevor man das freie Adenosin aus diesem Pikrat

herstellt, kristallisiert man das Pikrat so lange aus heißem Wasser oder 70%igen Alkohol unter Zugabe von Tierkohle um, bis es unter dem Mikroskop einheitlich kristallisiert ist. Erst wenn dies der Fall ist, zersetzt man das Adenosinpikrat zur Darstellung des freien Adenosins. Das Pikrat wird in viel heißem Wasser gelöst und die Lösung sofort nach dem Abkühlen mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Kongo angesäuert und die Pikrinsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die von Pikrinsäure befreite, immer noch gelbliche Lösung wird durch Zusatz von frischem Bariumkarbonat von Schwefelsäure befreit. Nach einigem Stehen setzt sich der Bariumniederschlag ab und läßt sich durch ein gehärtetes Filter abfiltrieren. Das Filtrat wird bei vermindertem Druck bis auf 10 cm^3 eingedampft und die Flüssigkeit dann im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehen gelassen. Nach 24stündigem Stehen, eventuell nach Animpfen scheidet sich das Adenosin in ieinen seidenglänzenden Nädelchen aus. Nach Umkristallisieren aus wenig heißem Wasser ist der Schmelzpunkt 229°.

Zytidin- und Uridinfraktion. Das Filtrat der Adenosinpikratfällung ist nicht ganz von Purinnukleosiden frei. Um diese zu entfernen, wird die Lösung mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 2% versetzt und dann 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Die Pikrinsäure wird dann mittels Äther ausgeschüttelt. Die freien Purine werden dann mit einer Lösung von Merkurisulfat in 5%ige Schwefelsäure gefällt. Nach dem Zusatz dieses Reagenses wird die Mischung über Nacht stehen gelassen. Das Filtrat vom Niederschlag wird vom Quecksilber und von Schwefelsäure befreit, auf Sirupkonsistenz eingedampft und dann mit einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure (heiß gesättigte Pikrinsäurelösung) versetzt, bis die Lösung zu opaleszieren anfängt. Läßt man über Nacht bei −1° stehen, so fällt meistens Zytidinpikrat aus, eventuell muß man noch im Vakuum konzentrieren. Das Zytidinpikrat fällt in kleinen mikrokristallinischen Drusen aus. Aus absolutem Alkohol umkristallisiert Schmelzpunkt 185 bis 187°. Die Darstellung des freien Zytidins geschieht über das Zytidinsulfat. Das Pikrat wird in heißem Wasser gelöst und die heiße Lösung mit Toluol ausgeschüttelt. Sobald die Lösung sich abzukühlen beginnt, wird sie mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Kongo versetzt und die Pikrinsäure weiter mit Äther entfernt. Nach dem Entfernen der Schwefelsäure wird die Lösung bei vermindertem Druck auf ein ganz kleines Volumen eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Alkohol versetzt, bis die Lösung zu opaleszieren beginnt. Das Sulfat scheidet sich in kurzer Zeit in langen prismatischen Nadeln aus. Schmelzpunkt 233°. Mehrmals umkristallisiertes Zytidinsulfat in wenig Wasser gelöst wird mit der genau berechneten Menge reinstem Bariumhydroxydes versetzt.

Die Lösung wird durch ein gehärtetes Filter filtriert uud in einer Glasschale bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum über Kalziumchlorid zur Trockne verdunstet. Die farblose, glasige Masse wurde dann in heißem, absolutem Alkohol gelöst. Aus dieser Lösung kristallisiert dann die freie Base beim Reiben mit dem Glasstab. Die Kristalle werden aus 90%ige Alkohol umgelöst. Lange Nadeln, die bei 220° sintern und bei 230° sich zersetzen.

Darstellung des Uridins. Die Mutterlauge des Zytidinpikrates wird nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure zur Entfernung der Pikrinsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Schwefelsäure wird dann quantitativ mit Barytlösung entfernt. Aus dieser Lösung läßt sich das Uridin durch Fällen mit Bleiazetat und Baryt gewinnen. Man fällt die Lösung mit basischem Bleiazetat, filtriert den Niederschlag ab und versetzt das Filtrat mit Barytlösung. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und zersetzt, indem man das Blei durch Schwefelsäure und diese hinwiederum quantitativ mit Barytlösung entfernt. Die hiebei entstehende klare Lösung wird bei vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand mit 95%igem Alkohol aufgenommen. Es ist ratsam den Rückstand mehrere Male mit Alkohol aufzunehmen und einzudampfen, um ihn möglichst von Wasser zu befreien. Beim Impfen mit Uridin erstarrt der Rückstand zu einer kristallinischen Masse. Nach Umkristallisieren aus 95%igem Alkohol lange prismatische Nadeln. Schmelzpunkt 165°.

Darstellung des Zytidins und Uridins durch Hydrolyse der Hefenukleinsäure mit verdünnter Schwefelsäure.

Die in der Hefenukleinsäure vorgebildeten Pyrimidinnukleotide zeigen sich gegenüber verdünnten Säuren resistenter als die Purinnukleotide. Während die Purinkomplexe durch zweistündiges Erhitzen mit 2%iger Schwefelsäure in Phosphorsäureribose und freies Purin aufgespalten werden, bleiben die Pyrimidinnukleotide bei dieser Behandlung ungespalten. Um zu den Pyrimidinnukleotiden zu gelangen, stellt man sich daher zuerst durch Hydrolyse mit verdünnter Mineralsäure ein Gemisch der Pyrimidinnukleotide her.

100 *g* Hefenukleinsäure werden in 1 *l* 2%iger Schwefelsäure 2 Stunden am Rückflußkühler im Ölbade bei 125° C gekocht. Die Flüssigkeit läßt man nicht vollständig abkühlen und versetzt sie mit Silberoxyd bis zu einem Überschuß an Silber. Die Silbersalze der Purinbasen scheiden sich dabei aus. Um die Fällung zu vervollständigen, läßt man das Gemisch über Nacht stehen und entfernt die Silberpurine durch Filtration. Das Filtrat neutralisiert man mit chemisch reiner Barytlösung. Es scheiden sich dadurch die

Silbersalze der Nukleotide mit Silberphosphat aus. Der Niederschlag wird mit Schwefelsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit. Das Filtrat vom Silbersulfid wird mit Barytlösung genau auf Phenolphthalein neutralisiert, vom Barytphosphat abfiltriert und bei vermindertem Druck fast bis zur Trockne eingedampft. Ein Teil der Salze geht dabei in eine in Wasser unlösliche Form über. Das Gemisch wird mittels Essigsäure in Lösung gebracht und die Lösung in absolutem Alkohol eingetragen. Die Bariumsalze der Pyrimidinnukleotide scheiden sich hiebei aus. Dieses Produkt ist frei von unveränderter Nukleinsäure und frei von Purinkomplexen. Das Gemisch der Barytsalze der Pyrimidinnukleotide gibt nur eine schwache Orzinprobe und reduziert nach Hydrolyse mit starker Mineralsäure *Fehling*sche Lösung nicht mehr. Die Substanzen sind optisch aktiv und drehen nach rechts. Zur weiteren Verarbeitung werden die Bariumsalze der Pyrimidinnukleotide gelöst und quantitativ vom Barium befreit. Die resultierende Lösung reagiert stark sauer. Sie wird mit wässerigem Ammoniak neutralisiert und dann mit einem Überschuß von Ammoniak bis zu einem Gehalt von 3% versetzt. Die ammoniakalische Lösung wird im Autoklaven, Ölbadtemperatur von 175° C, 3½ Stunden erhitzt oder im Einschmelzrohr während der gleichen Zeitdauer im Bombenofen auf 135° C gehalten. Die Isolierung der Pyrimidinkomplexe beruht auf ihrer Löslichkeit in Alkohol. Das Hydrolysenprodukt wird im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und der Rückstand mit Alkohol vier- bis fünfmal extrahiert. Der alkoholische Auszug wird bei vermindertem Druck vollständig eingeengt, der sirupöse Rückstand wieder mehrere Male mit Alkohol extrahiert und eingedampft. Von diesem Punkt an kann man auf verschiedene Weise verfahren. Entweder man trennt das Zytidin und Uridin mit Hilfe des Zytidinpikrates, wie dies bei der vorstehenden ammoniakalischen Hydrolyse der Hefenukleinsäure ausfühlich beschrieben wurde, oder man sucht das Zytidin durch sein schwer lösliches Nitrat vom Uridin abzutrennen. Das letztere Verfahren ist zu empfehlen, wenn es hauptsächlich auf die Herstellung von Zytidin ankommt. Es ist nicht ganz einwandfrei, wenn es sich um den analytischen Nachweis von Uridin neben Zytidin handelt, da das Uridin durch dieses Verfahren eventuell erst sekundär aus dem Zytidin entstehen könnte. Der alkoholische Auszug wird bis zu einem Volumen von zirka 35 cm^3 eingeengt und zirka 5 cm^3 Salpetersäure zugegeben. In kurzer Zeit ist die Lösung in einen dicken Brei von Kristallen erstarrt. Nach dem Abfiltrieren, Waschen mit 50%igem Alkohol und Trocknen wird es einmal aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 197°. Im Filtrat bleibt das Uridin in Lösung. Das Filtrat von salpetersaurem Zytidin wird bei Zimmertemperatur im Vakuumexsikkator von

Alkohol befreit und der Rückstand nach *Schotten-Baumann* benzoyliert. Auf diese Weise erhält man das Dibenzoyluridin.

Zur Darstellung des Gemisches der Pyrimidinnukleotide kann man einfacher verfahren, indem man nach den Angaben von *Thannhauser* und *Dorfmüller* die Hefenukleinsäure mit einer heiß gesättigten Lösung von Pikrinsäure 2 Stunden am Rückflußkühler kocht. Nach dem Erkalten filtriert man von der ausgeschiedenen Pikrinsäure und von den abgeschiedenen Purinpikraten ab, befreit die Lösung durch wiederholtes Umschütteln mit Äther von der gelösten Pikrinsäure und hydrolysiert hierauf wie oben beschrieben in 3%iger ammoniakalischer Lösung im Autoklaven bei einer Ölbadtemperatur von 175° C. Die Isolierung der Pyrimidinnukleotide geschieht dann in der angegebenen Weise.

Reindarstellung des Uridins.

Kommt es darauf an, nur das Uridin aus der Hefenukleinsäure in guter Ausbeute zu gewinnen, so kann man unter Opferung des Guanosins, Adenosins und Zytidins auf folgende Weise verfahren[1]):

Die Hydrolyse von 200 *g* Hefenukleinsäure in 3% ammoniakalischer Lösung wird im Autoklaven bei einer Ölbadtemperatur von 175° C auf die oben beschriebene Weise ausgeführt. Das Filtrat der Guanosinfraktion wird in einer Schale auf dem Dampfbad auf zirka 75 cm^3 eingedampft und der dunkle Sirup mit Hilfe von zirka 50 cm^3 heißem Wasser in einen 2 *l*-Fraktionierkolben gespült. Es werden darauf 1·5 *l* absoluten Alkohols zugegeben und die Lösung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. Während des Einleitens läßt man die Temperatur ruhig steigen, bis der Alkohol beinahe zu sieden anfängt, kühlt dann ab und fährt mit dem Einleiten fort, bis die Lösung gesättigt ist.

Durch dieses Verfahren wird erstens Spaltung der Puringlykoside und teilweise Ausscheidung der Purine als Chlorhydrate sowie eine teilweise Ausscheidung des Zytidins als salzsaures Salz erreicht; zweitens verwandelt sich auch der freie Zucker in das Äthylglykosid. Ohne von dem ausgeschiedenen Material abzufiltrieren, wird etwa ein Drittel der alkoholischen Salzsäure im Vakuum abdestilliert und dann nach Zugabe des gleichen Volumens Alkohol auf der Nutsche filtriert und mit Alkohol gut gewaschen. Das Filtrat hat jetzt ein Volumen von 3·5 *l*. Es wird nun unter Rühren Bleizucker, der in 95%igem Alkohol heiß gelöst ist, zugegeben, bis die Lösung nicht mehr sauer auf Kongo reagiert, und dann noch zirka 100 *g* im Überschuß. Es ist hiezu zirka 1 *kg* Bleizucker erforderlich,

[1]) *P. A. Levene* und *F. B. La Forge*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 608 (1912).



den man in 1·5 *l* Alkohol heiß löst. Der Bleizucker bewirkt Ausscheidung der Phosphorsäure sowie der Hauptmenge der Salzsäure. Nach dem Filtrieren und Waschen des Niederschlages mit Alkohol wird das Filtrat auf zirka 1 *l* im Vakuum eingeengt, auf 3 *l* mit Wasser verdünnt und so viel aufgeschlämmtes Silberoxyd zugegeben, bis die Lösung eine positive Reaktion auf Silber zeigt. Nach einigem Stehen wird von dem schmutzigen Niederschlag abfiltriert und das Filtrat von Blei und Silber durch Schwefelwasserstoff befreit. Das Silberoxyd bewirkt die Entfernung der noch vorhandenen Purine und der Salzsäure und wahrscheinlich auch noch anderer Verunreinigungen. Noch bevor man von den Sulfiden abfiltriert, gibt man so viel Bleizuckerlösung zu, bis der Überschuß an Schwefelwasserstoff abgesättigt ist. Nach dem Filtrieren und Waschen wird mit 350 cm^3 einer bei Zimmertemperatur gesättigten (zirka 40%igen) Lösung von Bleizucker versetzt und die Lösung, die jetzt ein Volumen von zirka 6 *l* hat, mit einer heißen, konzentrierten Lösung von Bariumhydroxyd versetzt, bis die Fällung vollständig ist. (Der Niederschlag, der sich bei der ersten Zugabe von Barythydrat bildet, löst sich wieder auf.) Ein Überschuß von Barythydrat ist streng zu vermeiden. Der sehr voluminöse, weiße Niederschlag wird auf der Nutsche abfiltriert, gut gewaschen und in einer starken Flasche mit verdünnter Schwefelsäure in der üblichen Weise zerlegt. Ohne zu filtrieren wird der Überschuß der Schwefelsäure durch Zugabe von wenig Bleikarbonat neutralisiert und dann nach dem Filtrieren der Überschuß von Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Lösung im Vakuum zum dicken Sirup konzentriert. Dieser wird in zirka 150 cm^3 Alkohol warm aufgenommen und in einer Schale auf dem Wasserbade auf zirka 60 cm^3 eingeengt. Manchmal fängt schon während des Eindampfens, jedenfalls beim Reiben mit dem Glasstab, die Kristallisation des Uridins an. Nach kurzer Zeit ist der Inhalt der Schale zu einem Kristallkuchen erstarrt. Nach einigem Stehen im Eisschrank wird die Kristallmasse mit wenig Alkohol angerieben und abfiltriert (Ausbeute aus 200 *g* Hefenukleinsäure zirka 16 bis 20 *g*). Zur völligen Reinigung wird dieses Produkt aus 8 Teilen 90%igen Alkohols unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Weiße, große Kristalle. Schmelzpunkt 165°.

Darstellung des Guanosins aus der Guanylsäure.

Das Guanosin (Guaninribosid) wird nicht nur durch partielle Hydrolyse der Hefenukleinsäure, sondern auch durch partielle Hydrolyse der aus Pankreas gewonnenen Guanylsäure erhalten. Die Herstellung der Guanylsäure geschieht entweder mittels des von *Steudel*[1]) beschriebenen Verfahrens oder auf die von *Levene*

[1]) Siehe S. 41 dieses Bandes dieses Handbuches.

und *Jacobs*[1]) angegebene Art. Die partielle Hydrolyse der Guanylsäure zur Darstellung des Guanosins geschieht entweder auf die für die Herstellung aus Hefenukleinsäure angegebene Weise mit verdünntem Ammoniak unter Druck oder durch neutrale Hydrolyse. Letzteres Verfahren vollzieht sich unter folgenden Bedingungen: 3 *g* Guanylsäure werden in einem geringen Überschuß von Kalilauge gelöst (Volumen der Lösung etwa 10 cm^3) und mit Essigsäure genau neutralisiert. Die Lösung wird im Bombenrohr 4 Stunden auf 135° erhitzt. Ist die angewandte Guanylsäure rein gewesen, so scheidet sich beim Abkühlen der Lösung das Guanosin in Form einer Gallerte aus, welche mikroskopisch ein filzförmiges Aussehen besitzt. Beim Umkristallisieren dieser Substanz erhält man das reine Guanosin. Wird die Hydrolyse mit Rohsäure ausgeführt, so bleibt die Substanz auch beim Umkristallisieren gallertig. In diesem Falle löst man die Gallerte, wie dies bei der Darstellung des Guanosins aus Hefenukleinsäure beschrieben wurde, in heißem Wasser, fällt mit Bleiessig und dann mit Bleiessigammoniak. Die letztere Fällung wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Bleisulfid eingeengt, bis das Guanosin zu kristallisieren anfängt.

Freies Guanosin ist nach *Levene* neben Guanylsäure im Pankreas[2]) vorhanden; um es zu gewinnen, wird die aus Pankreas gewonnene Rohguanylsäure in einem Überschuß von Ammoniak in heißem Wasser gelöst und auf einer Nutsche heiß in Alkohol filtriert. Es fällt hiebei das Ammonsalz der Guanylsäure aus, das Guanosin bleibt gelöst. Wird das Filtrat des Ammonsalzes der Guanylsäure bei vermindertem Druck eingeengt, so scheidet sich das Guanosin kristallisiert aus.

Darstellung des Inosins aus der Inosinsäure.

```
                                       CO — NH
    H2  H   H   H H                    |     |
OH.C — C — C — C.C ——— N — C          CH  Inosin (Hypoxanthosin).
        \ OH OH /   HC<     |          |
         \  O  /           N — C —— —N
```

Das Inosin wurde von *Haiser* und *Wenzel*[3]) im Fleischextrakte entdeckt und von *Levene* und *Jacobs*[4]) durch partielle Hydrolyse der

---

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 2469 (1909).

[2]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Biochem. Zeitschr. **28**. 127 (1910).

[3]) *F. Haiser* und *F. Wenzel*: Monatsh. f. Chem. **29**. 157 (1908).

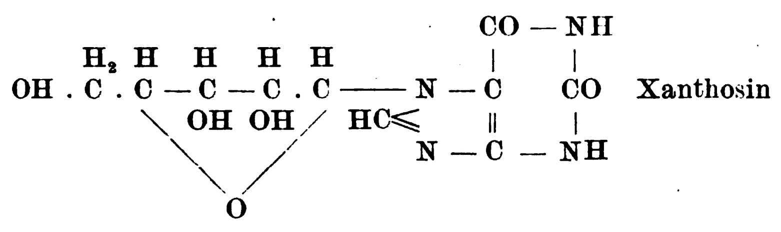
[4]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 335, 1198 (1909).

Inosinsäure erhalten. Die Darstellung der Inosinsäure nach *F. Haiser* ist von *Steudel* in dem einschlägigen Kapitel dieses Handbuches beschrieben. 50 *g* inosinsaures Barium werden in 200 cm^3 Wasser aufgenommen und im zugeschmolzenen Rohre 4 Stunden auf 135° erhitzt. Die von Bariumphosphat befreite Lösung wird hierauf auf 30 cm^3 eingeengt und die noch nicht zerlegte Inosinsäure mit Bleiessiglösung gefällt. Zu dem Filtrat von diesem Niederschlag wird dann abwechselnd wässerige Ammoniaklösung und Bleizuckerlösung zugegeben, und zwar so lange, als dabei sich noch ein Niederschlag bildet. Der Niederschlag wird in heißem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wird unter vermindertem Druck bei 45° eingeengt. Beim Abkühlen scheidet sich das Inosin in langen Nadeln ab. Der wasserfreie Körper zersetzt sich unter Verkohlen bei 215°.

Darstellung des Inosins aus Adenosin.

5 *g* Adenosin werden in einer Lösung von 20 *g* $NaNO_2$ in 60 cm^3 Wasser heiß gelöst und die Lösung mit 20 cm^3 Eisessig versetzt. Es beginnt sofort eine lebhafte Stickstoffentwicklung. Nach einigen Stunden wird die Mischung in Eis gestellt und mit verdünnter Schwefelsäure so lange versetzt, bis sie auf Kongopapier schwach sauer reagiert. Die Lösung wird dann mit mehreren Volumen absoluten Alkohols versetzt und nach einigem Stehen in einer Kältemischung abgesaugt. Das Filtrat wird mit einigen Tropfen Ammoniak neutralisiert und zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wird nochmals mit wenig Alkohol versetzt und wieder eingedampft. Alsdann wird er mit Essigsäureanhydrid übergossen und einige Minuten gekocht. Der Überschuß von Anhydrid wird abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform ausgekocht. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wird von anorganischen Salzen abfiltriert und das Chloroform abgedunstet. Alle diese Operationen sollen bei möglichst neutraler Reaktion vorgenommen werden, um eine Hydrolyse des Ribosids zu vermeiden. Auf diese Weise wird das entstandene Inosin in ein Azetylderivat übergeführt. Ohne dieses zu isolieren, kocht man den Rückstand mit einem Überschuß einer verdünnten Barytlösung eine halbe Stunde. Das Barium wird mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gefällt und die Lösung dann, um kleine Mengen aus dem Chloroform entstandener Salzsäure zu entfernen, mit wenig Silbersulfat versetzt. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt, der Überschuß des letzteren vertrieben und das Filtrat mit reinem Bleiessig genau gefällt. Das Inosin wird im Filtrat mit Bleizucker und Ammoniak niedergeschlagen, zerlegt und im Vakuum zum Kristallisieren gebracht.

Darstellung des Xanthosin aus Guanosin.



16 *g* Guanosin werden mit einer Lösung von 25 *g* Na NO_2 in 75 cm^3 Wasser aufgekocht. Das Guanosin scheidet sich beim Abkühlen wieder als eine Gallerte aus, die mit einem Glasstab zerteilt wird. Es werden nun 25 cm^3 Eisessig zugegeben. Nun wird tüchtig durchgeschüttelt, bis alles Guanosin in Lösung gegangen ist und die heftige Stickstoffentwicklung aufgehört hat, was nach etwa 5 Minuten der Fall ist. Die Lösung wird nun mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und abgekühlt. Beim Reiben fängt alsbald die Kristallisation des Xanthosins an, das sich als gelbes, kristallinisches Pulver rasch am Boden des Gefäßes absetzt. Nach 24 Stunden wird es abfiltriert. Ausbeute 6 *g*. Um es von den gelben Beimengungen zu befreien, wird es in heißem Wasser gelöst, heiß mit ein paar Tropfen Bleizucker versetzt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dem Aufkochen wird das Schwefelblei abfiltriert. Beim Erkalten scheidet sich das Xanthosin in farblosen glänzenden Prismen ab. Aus verdünntem Alkohol kristallisiert es in harten Warzen ohne Kristallwasser. Xanthosin hat keinen scharfen Schmelzpunkt.

Darstellung der Ribosephosphorsäure aus der Inosinsäure[1]).

```
OH\          H2 H  H  H    /H
O=P — O . C . C . C . C . C/      d-Ribosephosphorsäure.
OH/             OH OH OH    O
```

20 *g* kristallisiertes inosinsaures Barium werden mit 500 cm^3 1%iger Salzsäure gekocht. Nach dem Abkühlen wird Schwefelsäure bis auf 2% zugegeben. Hypoxanthin und die Salzsäure wird mit Silbersulfat entfernt. Das überschüssige Silber fällt man mit Schwefel wasserstoff und die Schwefelsäure durch Neutralisieren mittels Bariumkarbonat. Es ist nötig, das Bariumkarbonat frisch aus chemisch reinem Bariumhydrat zu bereiten. Das Filtrat enthält weder Stickstoff noch freie Phosphorsäure. Es wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei ein basisches Bariumsalz der gepaarten Phosphorsäure neben wenig

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 746 (1911).



Bariumkarbonat sich abscheidet. Das Ganze wird mittels Essigsäure in Lösung gebracht und filtriert. Aus dieser Lösung wird das Bariumsalz mit absolutem Alkohol als amorpher Niederschlag gefällt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Alkohol und Äther wird es getrocknet. Die Ausbeute beträgt 90% der Theorie. Um es kristallinisch zu erhalten, wird das Produkt fein gepulvert und mit 30 *cm*³ Wasser versetzt. Beim Umrühren geht die klebrig gewordene Masse ziemlich rasch in Lösung. Aus dieser Lösung erhält man das Bariumsalz kristallisiert sowohl durch Animpfen wie auch durch häufiges Reiben. Beim Stehen im Eisschrank bildet die Substanz am Boden des Gefäßes eine dicke Kristallschicht, die aus prachtvollen Aggregaten von sechseckigen Platten besteht. Die Mutterlauge enthält noch beträchtliche Mengen des Salzes. Wegen der leichten Bildung von basischem Salz ist es jedoch nicht empfehlenswert, die Mutterlauge zu konzentrieren. Um weitere Mengen kristallisierten Salzes zu erhalten, wiederholt man die Fällung mit Alkohol und verfährt weiter wie bei der ersten Kristallisation.

Darstellung der Phospho-d-ribonsäure aus der d-Ribosephosphorsäure.

```
CH\           H2 H   H   H
  O=P — O . C . C . C . C . COOH   Phospho-d-ribonsäure
OH/                 OH OH OH
```

Die Phosphoribonsäure wird aus der d-Ribosephosphorsäure durch Oxydation mit Brom oder Salpetersäure gewonnen.

Oxydation mit Salpetersäure. Das nach dem eben geschilderten Verfahren aus dem inosinsauren Barium (zirka 50 *g*) gewonnene Bariumsalz der d-Ribosephosphorsäure wird in Wasser gelöst und das Baryum quantitativ mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft. Diesen löst man in 30 *cm*³ Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·2) und läßt 24 Stunden bei 40° C stehen. Diese Lösung wird dann in 4 Teilen separat behandelt. Jeder Teil wird auf einem großen Uhrglas auf dem Wasserbade unter stetem Umrühren zur Trockne verdampft. Auf diese Weise wird verhältnismäßig wenig Phosphorsäure abgespalten. Das Produkt wird dann in 2 *l* Wasser gelöst, mit ein paar Tropfen Phenolphthalein versetzt und sodann Kalkmilch bis zur neutralen Reaktion zugegeben. Die voluminöse Fällung von Kalziumphosphat wird abfiltriert und das Filtrat gekocht. Es bildet sich dabei ein Niederschlag. Die Mutterlauge wird auf 500 *cm*³ konzentriert und weiter gekocht. Diese Behandlung wird mehrere Male wiederholt. In den Kalziumphosphatniederschlag werden beträchtliche Mengen der genannten

Substanz mitgerissen. Um diese zurückzugewinnen, wird das Kalziumphosphat in Wasser aufgeschwemmt und unter beständigem Turbinieren mit Essigsäure versetzt, bis der Niederschlag vollständig gelöst ist. Aus dieser Lösung wird die Phosphorsäure wieder mit Kalkmilch gefällt. Aus den vereinigten Mutterlaugen, die neben der Phosphorverbindung viel essigsaures Kalzium enthalten, wird die erstere nach dem Konzentrieren mit Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag wird in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat wird nach Vertreiben des Schwefelwasserstoffes, wie oben, mit Kalkwasser neutralisiert und aufgekocht und das Kalziumsalz gewonnen. Ausbeute 50% der Theorie.

Oxydation mit Brom. 7 *g* Ribosephosphorsaures Barium werden in Wasser aufgeschwemmt und das Barium quantitativ mit Schwefelsäure entfernt. Die Lösung wird dann auf 25 cm^3 gebracht und mit 5 *g* essigsaurem Kalzium und 3 *g* Brom versetzt. Die Mischung wird geschüttelt, bis das Brom vollständig gelöst ist, und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden ist das Brom fast verschwunden. Da die Lösung noch stark die Orzinprobe zeigt, werden noch 5 *g* essigsaures Kalzium und 3 *g* Brom zugesetzt. Nach 2 Tagen ist die Orzinprobe nur noch ganz schwach. Die Lösung wird erwärmt und das Brom mit Kohlensäure vertrieben. Man verdünnt mit Wasser, säuert mit Schwefelsäure bis zur Kongoreaktion an und entfernt mit Silbersulfat das Brom vollständig. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff vom Silber und von der Schwefelsäure quantitativ mit Baryt befreit. Nachdem man das Filtrat auf ein kleines Volumen eingeengt hat, wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Der Niederschlag, welcher wegen der Verunreinigung mit essigsaurem Kalzium von etwas gelatinöser Beschaffenheit ist, wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Die weitere Reinigung der Substanz wird mit Bleiessig, wie oben angegeben, ausgeführt.

Spaltung der Phospho-d-ribonsäure in d-Ribonsäure.

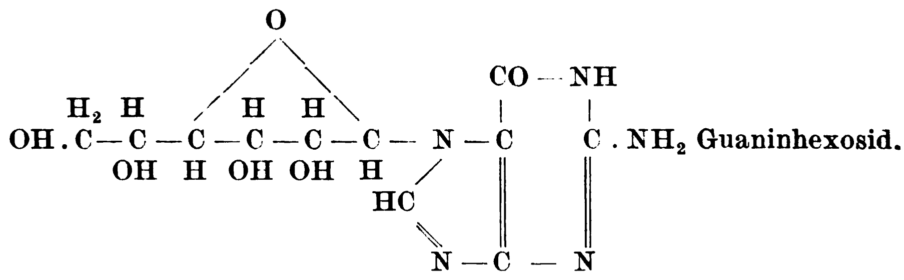
4 *g* Kalziumsalz der Phospho-d-ribonsäure wird in wenig Wasser und einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gelöst und das Kalziumsulfat mit 4 Volumen Alkohol gefällt. Es wird abgesaugt, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert, eingedampft und der Rückstand in 50 cm^3 Wasser aufgenommen. Es wird dann 4 cm^3 25%iges Ammoniak zugegeben und Eisessig, bis die Lösung auf Lackmus amphoter reagiert. Die Lösung wird im Einschlußrohr 3 Stunden auf 130° erhitzt. Beim Steigen der Temperatur über diesen Grad ist man der Gefahr der Bildung von Brenzschleimsäure ausgesetzt. Die Lösung wird mit Wasser verdünnt und genau mittels Bleiessig gefällt und der Niederschlag

abfiltriert. Dieser wird mittels verdünnter Schwefelsäure zerlegt und die überschüssige Schwefelsäure mit Bleikarbonat abgestumpft. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und das Filtrat eine Stunde mit Kadmiumkarbonat gekocht. Nach dem Filitrieren wird die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft. Der Sirup wird mit ein wenig ribonsaurem Kadmium geimpft und der Kristallisation überlassen. Nach 24 Stunden erstarrt das Ganze. Es wird nun mit wenig Wasser verrührt und auf einer Nutsche abgesaugt. Ausbeute 0·3 *g*. Die Substanz läßt sich aus wenig Wasser umkristallisieren.

Spaltung eines Ribosids zur Gewinnung der d-Ribose.

Die Spaltung kann man mit Inosin, Adenosin oder Guanosin vornehmen. 5 *g* Inosin werden in 500 cm^3 n/10-Schwefelsäure aufgelöst und eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Zu der Lösung wird ein kleiner Überschuß an Silbersulfat zugefügt und das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen. Vom Silberpurin wird abfiltriert und im Filtrat das gelöste Silberpurin durch Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure mit Bariumkarbonat entfernt. Es ist wichtig, um die Pentose kristallinisch zu erhalten, jede Verunreinigung fernzuhalten. Schon eine kleine Beimischung von Mineralsalzen hindert oft das Kristallisieren vollständig. Man benützt deswegen zum Entfernen der Schwefelsäure Bariumkarbonat, welches aus umkristallisiertem Barythydrat frisch bereitet worden ist. Das Filtrat vom Bariumsulfat wird unter vermindertem Druck zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit absolutem Alkohol ausgesogen. Die alkoholische Lösung wird im Vakuumexsikkator langsam eingedunstet und der Rückstand, wenn möglich, mit einem Kristall von d-Ribose angeimpft. Der Sirup erstarrt dann in einer kristallinischen Masse. Die Substanz wird aus heißem, absolutem Alkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 87°. Optische Aktivität $[\alpha]_D^{20} = -19{\cdot}2^\circ$.

Enzymatische Aufspaltung der Thymusnukleinsäure zur Darstellung eines Guaninhexosides[1]).



[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Journ. of biol. Chem. **12**. 377 (1912).

Versuche, aus der Thymusnukleinsäure mit analogen Methoden Nukleotide darzustellen, wie aus den pflanzlichen Nukleinsäuren, führten *Levene* und *Jacobs* nicht zu den erhofften Spaltstücken. Es gelang diesen Forschern, nur durch enzymatische Hydrolyse der Thymusnukleinsäure ein Nukleotid, das Guaninhexosid, herzustellen. Die Forscher geben jedoch in ihrer oben zitierten Arbeit nicht an, welches Enzym sie in dieser Hydrolyse benützt haben, so daß die folgende Darstellung der Isolierung des Guaninhexosids unvollständig ist.

Das Reaktionsgemisch der Thymusnukleinsäure und des Enzyms (?) wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und zu der Mischung 98% Alkohol so lange zugegeben, als sich ein Niederschlag bildet. Diese wird abfiltriert und die Mutterlauge unter vermindertem Druck zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wird wieder in Wasser gelöst, die Lösung mit einem Überschuß von Ammoniak alkalisch gemacht und die Fällung mit Alkohol wiederholt. Das zum Schluß verbleibende Filtrat wurde wiederum zur Trockne unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wird wieder mit Wasser aufgenommen und die noch in der Lösung befindlichen Nukleotide mittels basischem Bleiessig gefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und zum Filtrat Ammoniak und so lange Bleiazetatlösung zugegeben, als ein Niederschlag ausfällt. Dieser letztere Niederschlag wird abfiltriert und sorgsam mit kaltem Wasser ausgewaschen. Schließlich wird der Niederschlag in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und bei vermindertem Druck in einem dicken Sirup eingedampft. (Es ist unbedingt notwendig, alkalisch zu machen, da die Purinhexoside sehr leicht, selbst mit Essigsäure, zersetzt werden.) Beim Abkühlen verwandelt sich der Sirup in eine gelatinöse Masse, welche rohem Guanosin ähnelt. Die Substanz wird auf einer Nutsche über Seide abgesaugt, in heißem Alkohol gelöst und abkühlen gelassen. Beim Abkühlen bildet sich ein Bodensatz, der aus Rosetten, die unreinem Leucin ähneln, zusammengesetzt ist. Die Analyse dieser Substanz ergibt eine Zusammensetzung von $C_{11} H_{13} N_5 O_6$. Da durch die weitere Hydrolyse dieses Körpers mit 2%iger Schwefelsäure Guaninsulfat und ein Osazon vom Schmelzpunkt 198° sich isolieren lassen, ist anzunehmen, daß diese Substanz ein Guaninhexosid ist.

Derivate des Zytidins und Uridins[1]).

Zytidinsulfat $(C_9 H_{13} N_3 O_5)_2 H_2 SO_4$. Man löst Zytidinpikrat in heißem Wasser und schüttelt die heiße Lösung mit Toluol aus. Sobald die Lösung sich allmählich abzukühlen beginnt, wird

[1]) *P. A. Levene* und *La Forge:* Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 608 (1912).



sie mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Kongo versetzt und die Pikrinsäure weiter mit Äther entfernt. Nach dem Entfernen der Schwefelsäure wird die Lösung bei vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Alkohol versetzt, bis die Lösung zu opaleszieren beginnt. In kurzer Zeit scheidet sich das Sulfat in prismatischen Nadeln aus. Schmelzpunkt 233° C.

Zytidinchlorhydrat $C_9 H_{13} N_3 O_5 . HCl$ läßt sich auf ähnliche Weise wie das Sulfat erhalten. Schmelzpunkt 218° C.

Tribenzoylzytidin $C_9 H_{13} N_3 O_5 (C_6 H_5 CO)_3$ wird nach der Methode von *Schotten-Baumann* aus den Salzen des Zytidins erhalten. Schmelzpunkt 205° C.

5-Bromuridin $C_9 H_{11} N_2 Br O_6$. 2 *g* Uridin werden so lange mit Bromwasser versetzt, bis die rote Farbe eben nicht augenblicklich verschwindet, dann wird die Lösung im Vakuum zum Sirup eingedampft. Dieser wird in absolutem Alkohol aufgenommen und in einer Schale auf dem Wasserbade unter Rühren mit einem Glasstab eingedampft, bis der Körper kristallinisch erstarrt. Nach dem Anreiben mit absolutem Alkohol und Trocknen wiegt das Produkt 2 *g*. Nach Umkristallisieren aus 95%igem Alkohol Schmelzpunkt 181 bis 184°. Die gleiche Verbindung entsteht, wenn man eine konzentrierte Lösung von Uridin mit einem Überschuß von Brom behandelt und nach längerem Stehen mit Alkohol kocht.

4-Oxyuridin $C_9 H_{12} N_2 O_7$. Als Zwischenprodukt bei der Darstellung des Bromuridins entsteht das dem 4-Oxy-5-bromdihydrourazil analoge Derivat. Es läßt sich jedoch nur das Oxyuridin isolieren. 2 *g* Uridin werden mit Bromwasser behandelt, bis die Farbe eben bestehen bleibt, dann wird die Lösung eine Stunde mit Bleioxyd gekocht. Die Flüssigkeit wird ohne zu filtrieren auf 20 cm^3 eingedampft, nach dem Abkühlen mit zirka 2 Volumen Alkohol versetzt und nach einigem Stehen filtriert. Das Blei wird durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Lösung, die noch sauer auf Kongo reagiert, zum Sirup eingedampft und im Exsikkator stehen gelassen. Es kristallisiert langsam ein Körper aus, der nach 2 bis 3 Tagen von der anhaftenden Mutterlauge durch Streichen auf Ton befreit wurde. Die Kristalle werden mit Alkohol angerührt und nach Filtrieren aus demselben Lösungsmittel umkristallisiert. Schmelzpunkt 222 bis 223°. Das Oxyuridin gibt mit Phenylhydrazin ein Phenylhydrazid. Schmelzpunkt 209°.

5-Nitrouridinkarbonsäureanhydroverbindung $C_{18} H_{16} N_6 O_{17}$. 5 *g* Uridin werden in einer Glasschale mit 20 cm^3 Salpetersäure (1 Teil konzentrierte Salpetersäure + 1 Teil Wasser) auf dem Wasserbade zum Sirup konzentriert. Beim Reiben erstarrt

Physikalische Eigenschaften der Nukleoside und ihrer Derivate.

	Löslichkeit	Schmelzpunkt	Optische Aktivität	Wird gefällt durch
Guanosin (Guaninribosid) $C_{10} H_{13} O_5 N_3$ aus Wasser mit 2 H_2O	In Alkohol nicht löslich. In kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser leicht löslich. In Alkalien löslich.	237° C unter Verkohlen.	In $^1/_{10}$ n Lauge gelöst $[\alpha]_D^{20} = -60{\cdot}52°$.	Bleiessig + Ammoniak
Adenosin (Adeninribosid) $C_{10} H_{13} O_4 N_5$ aus Wasser mit 1·5 H_2O	In Alkohol schwer löslich. In heißem und kaltem Wasser ziemlich leicht löslich. In Alkalien löslich.	229° C.	In $^1/_{10}$ n Lauge gelöst $[\alpha]_D^{20} = -67{\cdot}3°$, in Wasser gelöst $[\alpha]_D^{20} = -63{\cdot}3°$.	Wie Guanosin.
Inosin (Hyporxanthinribosid) $C_{10} H_{12} O_5 N_4$ aus Wasser mit 2 H_2O	In Alkohol unlöslich. In kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser leicht löslich. In Alkalien löslich.	218° C.	In $^1/_{10}$ n Lauge gelöst $[\alpha]_D^{20} = -72{\cdot}45°$.	Wie Guanosin. Bildet ein schön kristallisiertes Natriumsalz.
Xanthosin (Xanthinribosid) $C_{10} H_{12} O_6 N_4$ aus Wasser mit 2 H_2O	In heißem 70%igem Alkohol löslich. In kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser leicht löslich. In Alkalien löslich.	Verkohlt ohne eigentlichen Schmelzpunkt.	In $^1/_2$ n Lauge gelöst $[\alpha]_D^{20} = -51{\cdot}21°$.	Wie Guanosin.
Guaninhexosid $C_{11} H_{15} O_6 N_5$	Löslich in heißem Alkohol.	—	—	In neutraler Lösung mit Silbernitrat.

(Fortsetzung I.)

	Löslichkeit	Schmelzpunkt	Optische Aktivität	Wird gefällt durch
Guanosinpikrat $C_{10}H_{13}O_5N_5 \times C_6H_2(NO_2)_3OH$	Löslich in Alkohol und Wasser.	180 bis 185° C.	—	—
Adenosinpikrat $C_{10}N_{13}O_4N_5 \times C_6H_2(NO_2)_3OH$	Löslich in Alkohol und Wasser.	180 bis 185° C.	—	—
Zytidin (Zytosinribosid) $C_9H_{13}O_5N_3$	Löslich in Alkohol und Wasser. In absolutem Alkohol schwer löslich.	230° C.	In Wasser $[\alpha]_D^{10} = +29{\cdot}63°$.	—
Uridin (Urazilribosid) $C_9H_{12}O_6N_2$	Löslich in Alkohol und Wasser.	165° C.	In Wasser $[\alpha]_D^{20} = +6{\cdot}38°$.	Bleizucker + Barythydrat.
Zytidinpikrat $C_9H_{13}O_5N_3 \times C_6H_2(NO_2)_3OH$	Löslich in Alkohol und Wasser.	185 bis 187° C.	—	—
Zytidinnitrat $C_9H_{13}O_5N_3 . HNO_3$	Löslich in Alkohol und Wasser.	197° C.	—	—
Zytidinsulfat $(C_9H_{13}O_5N_3)_2 . H_2SO_4$	Löslich in Alkohol und Wasser.	233° C.	$[\alpha]_D^{20} = +34{\cdot}0°$.	—

(Fortsetzung II.)

	Löslichkeit	Schmelzpunkt	Optische Aktivität	Wird gefällt durch
Tribenzoylzytidin $C_9H_{13}O_5N_3.(C_6H_5CO)_3$.	Löslich in Alkohol.	205° C.	—	—
Dibenzoyluridin $C_9H_{12}O_6N_2.(C_6H_5CO)_2$	Löslich in Alkohol.	—	—	—
Bromuridin $C_6H_{11}O_6N_2Br$	Löslich in Alkohol.	181 bis 184° C.	In Wasser $[\alpha]_D^{20} = - 15{\cdot}33°$.	—
Oxyuridin $C_7H_{11}O_9N_2$	Löslich in Alkohol.	222 bis 223° C.	—	—
Anhydroverbindung der Nitrouridinkarbonsäure $C_{18}H_{16}O_{17}N_6$	Löslich in Wasser.	zirka 200° C.	—	Mit Silbernitrat, gibt Ester.
Dihydrouridin $C_9H_{14}O_5N_2$	Löslich in Alkohol und Wasser.	—	$[\alpha]_D^{20} = + 39{\cdot}1°$.	—

dieser sofort zu einem harten Kuchen. Nach dem Abkühlen wird mit 75%igem Alkohol angerieben und filtriert. Nach Umkristallisieren aus 3 bis 4 Teilen Wasser kurze dicke Prismen, die sich oberhalb 200° ohne vorher zu schmelzen zersetzen.

Äthylester der 5-nitrouridinkarbonsäure. Die fein gepulverte Nitrouridinkarbonsäureanhydridverbindung wird mit 10 Teilen äthylalkoholischer Salzsäure 15 Minuten über freier Flamme gekocht. Es findet Auflösung der Säure statt, und bald darauf kristallisiert schon in der Hitze der Ester aus. Nach einigem Stehen im Eisschrank werden die Kristalle abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Ausbeute ist der angewendeten Menge Uridin gleich. Zersetzungspunkt oberhalb 200°. Auf analoge Weise wie der Äthylester läßt sich auch der n-Butylester darstellen. Schmelzpunkt 190 bis 192°.

Dihydrouridin. 4 *g* Uridin werden im Apparat von *Paal* unter Zugabe von 0·2 *g* kolloidalem Palladium reduziert. Die Reduktion geht sehr langsam vor sich und ist erst nach 30 bis 35 Stunden beendet. Die Reaktionsgeschwindigkeit scheint von der Menge des Palladiums abhängig zu sein. Nachdem das Palladium durch Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure gefällt ist, wird davon abfiltriert und die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup konzentriert. Dieser wird in absolutem Alkohol heiß gelöst und von einer geringen Menge aus dem Palladiumpräparat herstammenden Eiweiß abfiltriert. Das Reduktionsprodukt hinterbleibt nach dem Verdunsten des Alkohols als farbloser Sirup, der nicht kristallisiert. Das Dihydrouridin läßt sich im Gegensatz zum Uridin durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure in seine Komponenten Dihydrourazil und Ribose aufspalten.

2. Darstellung von Tri-, Di- und Mononukleotiden.

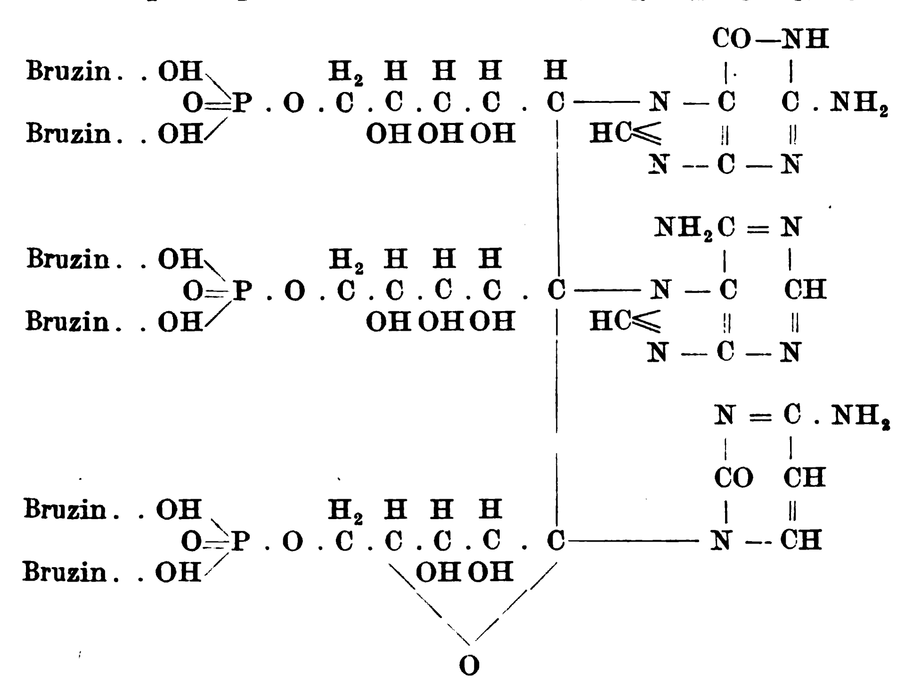
Darstellung der **Triphosphonukleinsäure** und der **Uridinphosphorsäure** aus der Hefenukleinsäure[1]).

Uridinphosphorsäure $C_9H_{13}O_9N_2P$.

```
Bruzin. . OH\         H2  H   H   H    H
           O=P . O . C . C . C . C  . C ---------- N — CO
Bruzin. . OH/              \OH OH   /               |    |
                             \      /               CO   CH
                              \    /                |    ||
                                O                  HN — CH
```

[1]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**. 121.

Triphosphonukleinsäure[1]) $C_{26}H_{42}O_{23}N_{13}P_3$



50 *g* Hefenukleinsäure (*Böhringer*) werden mit 140 *cm*³ 25%iger Ammoniaklösung am Rückflußkühler 2 Stunden gekocht. Schon nach gelindem Erwärmen beginnt die Hydrolyse unter starkem Schäumen. Man steigert die Temperatur, sobald das Schäumen nachläßt und erhitzt schließlich bis zum Kochen der klaren Flüssigkeit. Nach zweistündigem Kochen gießt man die erkaltete Lösung in die drei- bis vierfache Menge 96%igen Alkohols ein. Das sofort ausfallende Ammonsalz wird bei intensivem Durchrühren und Kneten mit Alkohol bald körnig und fest. Es wird abgesaugt und abermals mit Wasser gelöst. Die wässerige Lösung wird in der Siedehitze mit einer kochenden Lösung von basisch-essigsaurem Blei (D. A. B.) gefällt. Das ausfallende Bleisalz wird sofort abfiltriert, in kaltem Wasser sorgfältig aufgeschlämmt und mehrere Male mit Wasser dekantiert. Nach dreimaligem Dekantieren wird

[1]) Diese Formel der Triphosphonukleinsäure wird von *Thannhauser* und *Dorfmüller* nur als eine Arbeitshypothese aufgestellt, die lediglich die intermolekulare Verkettung der Mononukleotide in der Triphosphonukleinsäure verbildlichen soll. Den Untersuchern erscheint eine Verkettung der Mononukleotide durch eine Ätherbrücke wahrscheinlicher als eine C-C-Bindung der Purinzuckerverbindungen, jedoch macht die sterische Anordnung der Kohlehydratgruppen in der d-Ribose die Anschreibung einer solchen Ätherbrücke auf dem Papier unmöglich.

die Aufschlämmung in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Bleisulfid wird abfiltriert und das gelbgefärbte Filtrat im Vakuum zu einem goldgelben, dickflüssigen Sirup konzentriert. Der Sirup wird mit absolutem Alkohol so lange durchgeknetet, bis er eine weiße, trockene, körnige Masse bildet. Ausbeute an so erhaltener Rohsäure 20 bis 22 *g*. 20 *g* der Rohsäure werden in der elffachen Menge Wassers gelöst, die Lösung bis zur Siedehitze erwärmt und in eine heiße Lösung von 40 *g* wasserfreien Bruzin in 80 cm^3 96%igen Alkohols eingegossen. Es beginnt rasch die Abscheidung von kristallinischem Bruzinsalz. Man läßt bis 45° C abkühlen, saugt rasch von dem abgeschiedenen Bruzinsalz scharf ab und läßt bei Zimmertemperatur mehrere Tage stehen. Das von 45° bis Zimmertemperatur ausfallende Bruzinsalz wird zweimal aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 200 bis 205°. Dies ist das Bruzinsalz der Triphosphonukleinsäure $C_{29} H_{42} O_{23} N_{13} P_3 (C_{23} H_{26} N_2 O_4)_6$. Das von 100 bis 45° C ausfallende Kristallisat wird mit 900 bis 1000 cm^3 siedenden Wassers ausgezogen. Aus dieser wässerigen Lösung kristallisiert beim Abkühlen bis zu 45° ein Bruzinsalz, das bei 185 bis 187° schmilzt und das trotz mehrmaligen Umkristallisierens diesen Schmelzpunkt nicht ändert. Der Rückstand, der beim Ausziehen des Kristallisates von 100 bis 45° C mit 1000 cm^3 siedenden Wassers nicht in Lösung ging, wird mit sehr viel kochendem Wasser ebenfalls in Lösung gebracht und aus Wasser umkristallisiert. Dieses Bruzinsalz zeigt nach zweimaligem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 175 bis 177°. Es ist das Bruzinsalz der Uridinphosphorsäure $C_9 H_{13} O_9 N_2 P (C_{23} H_{26} O_4 N_2)_2$. Das Bruzinsalz 185 bis 187°, das bei den Analysen die gleichen Zahlen gibt als das Bruzinsalz der Triphosphonukleinsäure, wurde zuerst für das Bruzinsalz einer razemischen Triphosphonukleinsäure gehalten. Es zeigte sich aber später, daß es das Bruzinsalz der linksdrehenden Triphosphonukleinsäure ist, das noch mit etwas Uridinphosphorsäurebruzinsalz verunreinigt ist. Die Darstellung der freien Triphosphonukleinsäure aus dem Bruzinsalz 200 bis 205° und der Uridinphosphorsäure aus dem Bruzinsalz 175 bis 177° geschieht über das Silbersalz. Eine bestimmte Menge Bruzinsalz wird in heißem Wasser suspendiert, mit 95%iger Ammoniaklösung versetzt und die Lösung in Eis gestellt. Nach einstündigem Stehen wird vom ausgeschiedenen Bruzin abgesaugt und das Filtrat mit Silbernitratlösung versetzt. Der ausgeschiedene Silberniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt, vom Schwefelsilber abfiltriert und das Filtrat im Vakuum auf ein möglichst kleines Volumen eingeengt. Aus der sehr stark konzentrierten Flüssigkeit fällt auf Zusatz der fünf- bis sechsfachen Menge absoluten Alkohols die freie Säure in schneeweißen, amorphen Flocken aus. Mit Alkohol und Äther wiederholt gewaschen und im Vakuum

getrocknet, sind die freien Säuren einigermaßen luftbeständig. Da die freien Säuren außerordentlich rasch wieder hygroskopisch werden, sind sie stets im Vakuum aufzubewahren. In Wasser sind sie spielend löslich, in allen anderen Lösungsmitteln sind sie unlöslich. Außer den einheitlich kristallisierenden Bruzinsalzen konnte bisher weder von der Triphosphonukleinsäure noch von der Uridinphosphorsäure ein kristallisiertes Salz erhalten werden. Die optische Aktivität der Triphosphonukleinsäure in Wasser ist $(\alpha)_D^{20} = -19 \cdot 3^0$. Die optische Aktivität der Uridinphosphorsäure in Wasser ist $(\alpha)_D^{20} = +14 \cdot 4^0$.

Darstellung der Triphosphonukleinsäure und der Uridinphosphorsäure aus der Hefenukleinsäure durch Verdauung mit menschlichem Duodenalsaft[1]).

Der Duodenalsaft wird mittels der *Einhorn*schen Duodenalsonde unter Kontrolle des Röntgenschirmes gewonnen[2]). Die Aufspaltung der Hefenukleinsäure durch den Duodenalsaft führt zu den gleichen Spaltstücken wie die Aufspaltung durch milde ammoniakalische Hydrolyse.

40 *g* Hefenukleinsäure werden in einem 2 *l*-*Erlenmeyer*-Kolben mit 80 bis 90 cm^3 schwach alkalischem Duodenalsaft übergossen und mit zirka 200 cm^3 destilliertem Wasser versetzt. Das Gemisch wird heftig durchgeschüttelt und unter einer dicken Toluolschicht dreimal 24 Stunden bei 37° im Brutschrank unter wiederholtem Aufschütteln stehen gelassen. Die Flüssigkeit färbt sich bald grün. Die Nukleinsäure geht allmählich bis auf einen geringen Bodensatz in Lösung. Vom Rückstand wird abgegossen und durch ein Faltenfilter filtriert. Die Flüssigkeit wird im Vakuum auf die Hälfte eingeengt, abermals filtriert und dann mit so viel 96%igem Alkohol versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Der sehr voluminöse Niederschlag wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Hierauf bringt man den Niederschlag wieder durch nicht zuviel Wasser in Lösung, filtriert eventuell vom Ungelösten ab und engt im Vakuum die wässerige Lösung bis zur vollständigen Trockenheit ein. 20 *g* des hinterbleibenden Pulvers wird in der elffachen Menge heißen Wassers gelöst und die heiße Flüssigkeit in eine Lösung von 40 *g* wasserfreien Bruzin in 80 cm^3 96%igem Alkohol eingegossen. Diese Lösung verteilt man auf drei bis vier große, flache Glasschalen und läßt einige Tage bei Zimmer-

[1]) *Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**. 145 (1917).

[2]) *S. J. Thannhauser*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 329 (1914); *K. Graßmann*: Inaug.-Diss. München 1917.

temperatur abdunsten. Die Flüssigkeit erstarrt zu einer drusenförmigen Kristallmasse. Die Kristallmasse wird mit wenig kaltem Wasser angerührt, abgenutscht und wiederholt mit Chloroform dekantiert. Die hinterbleibende Substanz stellt ein Gemisch der Bruzinsalze der durch die Verdauung entstehenden Nukleotide dar. Ein direktes, fraktioniertes Kristallisieren dieses Gemisches hat sich als unzweckmäßig erwiesen. Man suspendiert deshalb das Bruzinsalzgemisch in Wasser, zersetzt mit 25%igem Ammoniak, läßt einige Zeit in Eis stehen und filtriert vom abgeschiedenen Bruzin ab. Das Filtrat wird mit basisch essigsaurem Blei so lange versetzt, als ein Niederschlag entsteht. Das entstandene Bleisalz wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Bleisulfid abfiltriert und die Flüssigkeit im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Hierauf wird der Sirup mit Alkohol durchgeknetet, bis er körnig fest geworden ist. Die Verarbeitung dieser Rohsäure auf die Bruzinsalze der Triphosphonukleinsäure und der Uridinphosphorsäure geschieht in der gleichen Weise, wie dies bei vorstehender Darstellung der ammoniakalischen Hydrolyse beschrieben ist.

Darstellung der kristallisierten **Zytidinphosphorsäure** durch Hydrolyse der Triphosphonukleinsäure mit konzentrierter Pikrinsäurelösung[1].

```
                                          N — C . NH2
                                          |     |
                                          OC    CH
OH\          H2 H  H  H  H                |     ||
O =P — O . C . C . C . C . C — N -- CH
OH/                  \OH OH/
                       \  /
                        O
```

oder

```
N = C . NH2
|     |
OC    CH
||    |     H  H  H  H  H2        /OH
HN — C — C . C . C . C . C . O . P = O
            \ OH OH /               OH
               O
```

Durch Hydrolyse mit konzentrierter Pikrinsäurelösung werden in dem Molekül der Triphosphonukleinsäure die Purinnukleotide vollständig aufgespalten und als Pikrate ausgefällt, während das Zytidinnukleotid unzersetzt bleibt und als Bruzinsalz aus dem

[1]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. **104**. 75 (1918).

Hydrolysengemisch isoliert werden kann. Aus dem Bruzinsalz der Zytidinphosphorsäure läßt sich die freie Säure als schön kristallisierter Körper erhalten.

30 *g* Bruzinsalz der Triphosphonukleinsäure, Schmelzpunkt 205°, werden in warmem Wasser suspendiert, mit überschüssigem Ammoniak versetzt und dann mit Eis gekühlt. Das Bruzin fällt vollständig aus. Nach dem Abkühlen auf 0° wird das Bruzin abfiltriert, auf der Nutsche scharf abgepreßt und mit Eiswasser nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum bei 40 bis 50° stark konzentriert. Die konzentrierte Lösung des Ammonsalzes wird mit viel Pikrinsäure in Substanz zirka 30 *g* versetzt und die Mischung 1½ bis 2 Stunden am Rückflußkühler im Sieden erhalten. Zuerst löst sich alle Pikrinsäure in der Siedehitze, dann fällt allmählich unter Stoßen ein Pikrat aus. Man kocht vorsichtig trotz des Stoßens die vorgeschriebene Zeit weiter. Nach 2 Stunden läßt man abkühlen und stellt die Hydrolysenflüssigkeit zur vollständigen Ausfällung der Purinpikrate, des Ammoniumpikrates und unveränderter Pikrinsäure über Nacht in den Eisschrank. Die ausgefallenen Pikrate und die Pikrinsäure werden abgenutscht, das Filtrat im Vakuum bei 40 bis 50° stark konzentriert und nochmals in den Eisschrank gestellt. Es scheidet sich neben Pikrat noch eine gallertartige Substanz ab. Man saugt abermals ab, wäscht mit wenig Wasser nach und äthert das mit etwas Wasser noch weiterverdünnte Filtrat aus, bis alle Pikrinsäure entfernt ist. Die ausgeätherte Lösung wird im Vakuum bei 30 bis 40° stark eingeengt und dann im Vakuum Exikkator über konzentrierte Schwefelsäure vollständig konzentriert. Der hellgelbe Sirup wird mit der zehn- bis elffachen Menge Wasser gelöst und die siedend heiße Lösung in eine heiße alkoholische Bruzinlösung, die an Bruzin die doppelte Gewichtsmenge des Sirups gelöst enthält, gegossen. (Verhältnis des Bruzins zu Alkohol wie 1 : 2.) Es beginnt alsbald eine Abscheidung von Bruzinsalz, die bei längerem Stehen im Eisschrank vollständig wird. Das ausgefallene Bruzinsalz wird abgesaugt, mit wenig Alkohol nachgewaschen und mit warmem Chloroform dekantiert. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser schmilzt das Bruzinsalz der Zytidinphosphorsäure bei 180 bis 182°.

Zur Darstellung der freien Zytidinphosphorsäure wird das Bruzinsalz in heißem Wasser gelöst, mit überschüssigem Ammoniak versetzt und bei 0° unter Eiskühlung stehen gelassen. Das ausgefallene Bruzin wird abgesaugt, das Filtrat im Vakuum konzentriert und die ammoniakfreie Lösung des Ammonsalzes mit Bleiessig (D. A. B.) gefällt. Das ausgefallene Bleisalz wird in Wasser aufgeschlämmt, abfiltriert und mehrere Male unter Aufschlämmen mit Wasser dekantiert. Die Suspension des Bleisalzes in Wasser wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert und das

Filtrat im Vakuum bei 40° auf zirka 30 cm^3 eingeengt. Die konzentrierte Lösung läßt man über Schwefelsäure langsam im Vakuumexsikkator eindunsten. Beim Eindunsten im Exsikkator scheidet sich die Zytidinphosphorsäure in derben, weißen Kristallen (monoklin-sphenoidisch) aus. Aus Wasser umkristallisier Schmelzpunkt 227°. Optische Aktivität in $^1/_2$ n-Na-Lauge $[\alpha_D]^{20}$ + 23·43°.

Darstellung der **Uridinphosphorsäure** und der **Zytidinphosphorsäure** durch Hydrolyse der Hefenukleinsäure mit konzentrierter Pikrinsäurelösung[1]).

Zu 100 *g* Hefenukleinsäure in 500 cm^3 Wasser werden 60 *g* Pikrinsäure hinzugegeben und 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Aufarbeitung der Hydrolysenflüssigkeit geschieht auf die gleiche Weise wie dies bei der vorstehenden Pikrinsäurehydrolyse der Triphosphonukleinsäure beschrieben ist. Nach dem Entfernen der Purinpikrate und der Pikrinsäure aus der Hydrolysenflüssigkeit wird die Flüssigkeit im Vakuum zum Sirup eingeengt. Der Sirup (ungefähr 60 bis 70 *g*) wird in 500 cm^3 Wasser siedend heiß gelöst und in eine heiße alkoholische Bruzinlösung, die zirka 60 bis 70 *g* Bruzin gelöst enthält, eingegossen. Die kochende Lösung läßt man bis 60° C abkühlen, saugt rasch vom ausfallenden Bruzinsalz ab und läßt dann weiter bei Zimmertemperatur stehen. Kristallisat I (100 bis 60°) enthält zum größten Teil das Bruzinsalz der Uridinphosphorsäure; Kristallisat II (60°-Zimmertemperatur) ist noch ein Gemisch der Bruzinsalze der Uridin- und Zytidinphosphorsäuren. Kristallisat I wird mit heißem Wasser ausgezogen und der ungelöste Rückstand in viel heißem Wasser umkristallisiert.

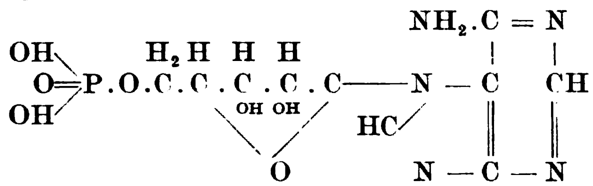
Man erhält auf diese Weise das Bruzinsalz der Uridinphosphorsäure, Schmelzpunkt 175 bis 177°. Kristallisat II wird nochmals auf die beschriebene Weise fraktioniert kristallisiert. Man erhält in der Fraktion 60°-Zimmertemperatur das Zytidinphosphorsäurebruzinsalz schließlich nahezu vollständig rein. Schmelzpunkt 180 bis 182°. Durch das wiederholte fraktionierte Kristallisieren wird allerdings die Ausbeute an reinem Zytidinphosphorsäurebruzinsalz sehr gering. Es empfiehlt sich daher, zur Darstellung des Zytidinphosphorsäurebruzinsalzes über die Triphosphonukleinsäure zu gehen und zuerst die Hefenukleinsäure in der beschriebenen Weise durch milde ammoniakalische Hydrolyse in Triphosphonukleinsäure und Uridinphosphorsäure aufzuspalten und dann die Triphosphonukleinsäure zur Darstellung der Zytidinphosphorsäure mit Pikrinsäure zu hydrolysieren.

---

[1]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Zeitschr. f. physiol. Chemie **104**. 65 (1918).



Darstellung der kristallisierten Adenosinphosphorsäure[1]).



40 *g* Bruzinsalz der Triphosphonukleinsäure Schmelzpunkt 205° (auch das noch unreine Produkt Schmelzpunkt 187° kann verwendet werden) werden in zirka 200 cm^3 Wasser kochend heiß suspendiert, mit zirka 100 cm^3 konzentrierter Ammoniaklösung (25%) bis zur Lösung versetzt und stehen gelassen. Nach dem Erkalten wird in Eis gestellt, bis die Abscheidung des Bruzins vollständig beendet ist (zirka vier Stunden). Das Bruzin wird abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen, hierauf engt man das Filtrat im Vakuum bei 40 bis 50° auf zirka 80 bis 100 cm^3 ein. Durch das Einengen im Vakuum wird das Ammoniak vollständig vertrieben. Sollte noch gallertiges Ammonsalz hiebei abscheiden, so bringt man es durch Zugabe von wenig Wasser in Lösung. Die Ammonsalzlösung wird über Nacht stehen gelassen, um noch Spuren von nicht ausgefälltem Bruzin zur Abscheidung zu bringen. Von diesen letzten Resten von Bruzin wird abfiltriert und die ammoniakfreie Lösung des Ammonsalzes mit Bleiessig (O. A. B.) gefällt. Das ausgefallene Bleisalz wird abfiltriert, mehrere Male mit Wasser angerührt und wieder abgesaugt, um den Überschuß von Bleiessig vollständig zu entfernen. Die Aufschwemmung des Bleisalzes in Wasser wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert und das ungefärbte, wasserklare Filtrat im Vakuum bei 40° auf zirka 40 cm^3 eingeengt. Diese Lösung stellt man über Schwefelsäure in den Exsikkator. Nach zehn Stunden (beim Animpfen in kurzer Zeit) beginnt ein Körper in kleinen Nadeln zu kristallisieren. Nach 24stündigem Stehen wird abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen (Kristallisat I). Im Verlauf von zirka acht Tagen scheidet sich im Vakuum abermals aus der Mutterlauge ein kristallinischer Körper aus (Kristallisat II). Kristallisat I (zirka 1·5 *g*) wird in der zwölffachen Menge Wasser gekocht und vom Ungelösten abfiltriert. Aus dem Filtrat scheidet sich die Adenosinphosphorsäure in pfahlartig einseitig zugespitzten Kristallen ab. Beim Umkristallisieren aus Wasser können durch langsames Auskristallisieren mehrere millimeterlange Kristalle erhalten werden. Diese Kristalle enthalten Kristallwasser. Der Schmelzpunkt der Adenosinphosphorsäure liegt scharf bei 208° unter Aufschäumen. Beim Trocknen im Toluolbad bei 130° im Vakuum verliert die Salzsäure ihr Kristallwasser. Die

[1]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. 107. 157 (1919).



optische Aktivität der Adenosinphosphorsäure ist in 0·5 n-Lauge gelöst. $\alpha_D^{20} = -48{\cdot}03^0$.

Darstellung der Thymohexosephosphorsäure $C_{11}H_{17}N_2PO_{10}$ aus der Thymusnukleinsäure durch Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure[1]).

Die Thymohexosephosphorsäure ist bisher weder als Salz noch als freie Säure in kristallinischer Form erhalten worden. Die bisher erhaltenen Produkte sind jedenfalls noch nicht genügend rein.

80·0 *g* Thymusnukleinsäure, aus der Milz dargestellt, werden in 1500 *cm*³ n/10-Schwefelsäure 4 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und im Filtrate ein Überschuß von Silbersulfat aufgelöst. Es scheiden sich dabei beim 24stündigen Stehen die Silberpurine vollständig aus. Das Filtrat von diesem Niederschlag wird mit Barytwasser neutralisiert. Dabei bildet sich ein zweiter Niederschlag. Dieser wird von Silber mittels Schwefelwasserstoff und von überschüssigem Baryt mittels Kohlensäure befreit. Das schließlich erhaltene Filtrat wird dann unter vermindertem Druck bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit Alkohol gefällt. Nach längerem Aufbewahren unter Alkohol geht ein Teil der Substanz in eine unlösliche Form über. In dieser Hinsicht verhält sie sich ähnlich den Bariumsalzen anderer gepaarter Phosphorsäureverbindungen. Diese Substanzen besitzen alle die Eigenschaft, beim Kochen ihrer Lösung oder beim Aufbewahren in Alkohol in eine unlösliche Form überzugehen. Das unlösliche Bariumsalz besitzt die Zusammensetzung des Salzes der Thymoglykophosphorsäure. Beim Spalten mittels 25%iger Schwefelsäure lassen sich aus der Substanz Thymin und Lävulinsäure gewinnen. Das Filtrat von dem unlöslichen Salze kann wieder mit Alkohol gefällt werden. Durch mehrmaliges Umfällen erhält man auch auf diese Weise ein Bariumsalz von der Zusammensetzung der Thymoglykophosphorsäure.

Darstellung der Thyminsäure (thyminsaures Baryum)[2]).

```
        Phosphorsäure — Kohlehydrat
   Ba<                  \
        Phosphorsäure — Kohlehydrat — Zytosin
              |
        Phosphorsäure — Kohlehydrat — Thymin
   Ba<                  \
        Phosphorsäure — Kohlehydrat.
```

[1]) *P. A. Levene* und *J. A. Mandel*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**. 905 (1908); *Carl Luca Alsberg*: Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **51**. 240 (1904).

[2]) *R. Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**. 296 (1918).

(Da in dieser Formel das Kohlehydrat mit $C_6 H_{10} O_0$ (Furan) vom Autor angenommen wird, berechnet sich die Formel des Bariumsalzes mit $C_{33} H_{41} O_{26} N_5 P_4 Ba_2$.)

Kossel und *Neumann*[1]), welche die sogenannte Thyminsäure erstmals darstellten, nahmen eine Zusammensetzung der Thyminsäure an, in der nur das Thymin als Pyrimidinrest enthalten ist. *Feulgen* legt der Thyminsäure eine Zusammensetzung zugrunde, die der obigen schematischen Formel entspricht und Zytosin und Pyrimidin als Nukleotidkomplexe enthält. Die beiden Purine der ursprünglichen Thymusnukleinsäure sind abgespalten und der Phosphorsäurekohlehydratrest weist zwei freie Aldehydgruppen auf. Das thyminsaure Barium, nach *Feulgen* dargestellt, ist ein weißes amorphes Pulver, das sich beim Aufbewahren unter Verfärbung zersetzt. Die freie Säure ist überhaupt nicht darstellbar. Die freie Thyminsäure ist „gegen sich selbst" so empfindlich, daß wässerige Lösungen von thyminsaurem Barium bei Salzsäurezusatz sofort rot werden. Die Darstellung des thyminsauren Bariums (*Feulgen*) geschieht auf folgende Weise.

In einem Literkolben fügt man zu 600 cm^3 luftfreiem Wasser unter gutem Umschütteln 20 *g* absolutes (von lufttrockenem entsprechend mehr) a-nukleinsaures Natrium[2]) derart hinzu, daß nichts am Halse hängen bleibt, und löst es auf dem Wasserbade. Dann bringt man die Temperatur der Lösung auf 80°, fügt 50 cm^3 2 n Schwefelsäure von 80° hinzu und versenkt den Kolben nach Umschwenken sofort in ein vorbereitetes Wasserbad von 80°. Man läßt die ersten zehn Minuten ruhig im Wasserbade stehen, schüttelt aber dann einige Male um, wobei im Laufe einer Viertelstunde völlige Lösung eintritt. Nach Ablauf von einer halben Stunde, vom Einbringen der Schwefelsäure an gerechnet, fügt man 7 *g* sehr fein pulverisiertes Silbersulfat hinzu und schüttelt während der nächsten 10 Minuten etwa alle Minuten kräftig um. Nach diesen 10 Minuten ist die Fällung der Purine beendet, was man daran erkennt, daß der Niederschlag sich rasch absetzt und eine klare Flüssigkeit darüber steht. Innerhalb von 40 Minuten muß also der Prozeß beendet sein. Die Flüssigkeit wird dann sofort unter der Wasserleitung abgekühlt und dann noch unter Umschütteln eine Viertelstunde in Eiswasser gekühlt, um die Silberpurine sowie auch den größten Teil des in der Wärme gelösten Silbersulfates vollends abzuscheiden. Man saugt jetzt über einem gehärteten Filter ab und wäscht die Silberpurine mit etwa 20 cm^3 Wasser nach. Die Filtration verläuft sehr rach.

In den vereinigten Filtraten kann man nun folgende Reaktionen vornehmen: Auf Zusatz von etwas kalt gesättigter Silber-

[1]) *A. Kossel* und *A. Neumann*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 74 (1896).

[2]) *R. Feulgen*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**. 261 (1914; **100**. 257 (1917).

sulfatlösung darf kein Niederschlag auftreten, dies würde freie, aber noch nicht niedergeschlagene Purine anzeigen. Wird die Probe dann auf 5 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, so darf weder beim Erhitzen noch auch beim Abkühlen ein Niederschlag oder nennenswerte Trübung auftreten, dies würde nämlich beweisen, daß zwar alle freien Purine ausgefällt, daß aber noch nicht alle Purine abgespalten wären.

Zur weiteren Verarbeitung wird die schwefelsaure Flüssigkeit in einem Literkolben, mit einer heißen Lösung von 5 *g* Bariumchlorid und 35 *g* Bariumazetat in 60 cm^3 Wasser versetzt, zur besseren Abscheidung des Baryumsulfates im Wasserbade von 80° auf etwa 90° erwärmt, dann wieder abgekühlt und der Kolben zum Absetzen des Bariumsulfates in möglichst schräger Lage auf einen Strohkranz gesetzt. Nach 1 bis 2 Stunden saugt man die Flüssigkeit ab und zwar zweckmäßig durch ein Talkumfilter, das hergestellt wird, indem man einen kleinen Teelöffel Talkum in etwas Wasser aufschwemmt und die Masse unter Saugen mit der Pumpe auf ein angefeuchtetes Filter im *Büchner*schen Trichter bringt. Man wäscht mit etwas verdünnter Essigsäure das Filter aus und gießt unter vorsichtigem Abgießen erst die Flüssigkeit, dann den Niederschlag auf das gedichtete Filter. Das Filtrat fließt klar und die Filtration verläuft schnell. Bevor der Niederschlag rissig wird, gießt man 20 cm^3 Wasser ohne Nachhilfe des Spatels nach. Das Filtrat wird nunmehr mit dem dreifachen Volumen Alkohol gefällt.

Man läßt den sich bildenden weißen, großflockigen Niederschlag absetzen, was in etwa einer Viertelstunde erreicht sein wird, härtet ihn zunächst durch öfteres Dekantieren mit 96%igem Alkohol und saugt schließlich unter Zuhilfenahme von Alkohol und eventuell Äther ab. Es ist zu beachten, daß vor gehörigem Entwässern der Niederschlag nicht abgesaugt werden darf, da er sonst sehr leicht klebt. Ausbeute zirka 60% der Theorie.

Manchmal fällt das thyminsaure Barium bei der Alkoholfällung nicht flockig, sondern klumpig aus; in einem solchen Falle ist vor dem Absaugen für gute Entwässerung durch wiederholtes Verreiben mit Alkohol Sorge zu tragen. Die im Vakuumexsikkator getrocknete Substanz ist ein lockeres, weißes Pulver. Vieles Umfällen ist völlig zwecklos, eine Verbesserung wird dadurch nicht erzielt, höchstens kann man es durch Umfällen vor der Analyse etwas besser von den in erheblicher Menge mitgerissenen Bariumsalzen (besonders $BaCl_2$) trennen; doch hat andererseits das thyminsaure Barium zum schönen Ausflocken mit Alkohol immer etwas Bariumsalz nötig.

Darstellung der Hexothymidindiphosphorsäure und der Hexozytidindiphosphorsäure durch Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure der Nukleinsäure aus Fischsperma[1]).

200 *g* Nukleinsäure aus Fischsperma werden in 3 *l* 2%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade so lange erhitzt, bis sie vollständig gelöst sind, und dann 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Abkühlen gibt man Silberoxyd so lange hinzu, als sich ein Niederschlag von Silberpurinen bildet und läßt dann die Mischung über Nacht stehen. Das Filtrat vom Purinsilber wird hierauf weiter mit Silberoxyd versetzt, bis ein Tropfen der Lösung in verdünnter Natronlauge einen Niederschlag von Silberoxyd gibt. Zu dieser Lösung wird eine heiß gesättigte Lösung von Bariumhydrat gerade bis zur alkalischen Reaktion auf Lackmus zugegeben. Der sich hiebei bildende Niederschlag, welcher die Silber- und Bariumsalze der Nukleotide, der Phosphorsäure und der freien Pyrimidine enthält, wird rasch abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat gibt, nachdem man es mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit hat, die Orzinprobe und reduziert mäßig *Fehling*sche Lösung. Es enthält Hexosephosphorsäure, welche sich in geringer Ausbeute als Bariumsalz daraus isolieren ließ.

Die Zersetzung des Silber-Bariumniederschlages geschieht durch Aufschwämmen des Niederschlages in ziemlich viel verdünnter Schwefelsäure durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die Aufschlämmung. Nach der vollständigen Zersetzung wird das Filtrat von Schwefelwasserstoff befreit und mit Quecksilbersulfatlösung versetzt. Der hiebei entstehende schwere Niederschlag des Quecksilbersalzes des gemischten Nukleotides wird abfiltriert und gut gewaschen. In dem Filtrat sind außer freier Phosphorsäure Mononukleotide enthalten, deren Isolierung späterhin beschrieben wird. Das Quecksilbersalz wird in Wasser aufgeschlämmt und vollständig mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Mischung wird mit reinem Bariumkarbonat neutralisiert und mit Essigsäure angesäuert, um die Nukleotide in Lösung zu erhalten. Das Filtrat wird auf ein kleines Volumen konzentriert und dann mit der drei- bis vierfachen Menge Alkohol gefällt. Der ausfallende Niederschlag des Bariumsalzes wird filtriert (mit 70%igem Alkohol dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 50 bis 75 *g*.

Das Bariumsalzgemisch wird in 5 bis 10 Teilen Wasser aufgelöst und das Barium mit einem geringen Überschuß von Schwefelsäure entfernt. Zum Filtrat gibt man 50%ige Schwefelsäure so lange zu, bis die Lösung 10% ist. Hierauf wird so lange eine konzentrierte

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*: Journ. of biol. Chem. **12.** 411 (1912).

Phosphorwolframsäurelösung zugegeben, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Das Phosphorwolframat fällt als eine schwere gummiartige Masse zu Boden. Nachdem man eine Weile bei 20° stehen gelassen hat, gießt man die überstehende, klare Flüssigkeit ab. Das Phosphorwolframat wird wiederum in mehreren Volumen heißen Wassers gelöst und abermals durch Zugabe von 10%iger Schwefelsäure niedergeschlagen. Die Phosphorwolframsäurefällung enthält ein Dinukleotid, welches aus der Hexothymidin- und der Hexozytidinphosphorsäure zusammengesetzt ist. Die beiden Mutterlaugen werden zusammengegossen und die Phosphorwolframsäure mit Amylalkohol ausgeschüttelt. Die Lösung wird dann mit einer Lösung von Barythydrat so lange versetzt, bis sie gegen Phenolphthalein gerade alkalisch ist. Hierauf abermals mit Essigsäure angesäuert, filtriert und auf einige hundert Kubikzentimeter konzentriert. Zur weiteren Reinigung werden die Nukleotide wieder mit Quecksilbersulfat niedergeschlagen und der Quecksilberniederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Im Filtrat wird nach dem Entfernen des Schwefelwasserstoffes die vorhandene Spur von Schwefelsäure mit Barythydrat quantitativ entfernt. Die Azidität der Lösung wird dann mittels Titration bestimmt und eine äquivalente Menge käuflichen Bruzinsalzes, in heißem Alkohol gelöst, zu der Mischung zugegeben. Obwohl die Kristallisation sofort beginnt, wird die ganze Mischung im Vakuum zur Trockne konzentriert und der Rückstand in heißem 85%igen Alkohol aufgelöst. Beim Abkühlen kristallisiert das Gemisch zu einer soliden Masse. Nach 24stündigem Stehen wird die Masse mit einem Glasstab aufgerührt und mit 75%igem Alkohol gewaschen und filtriert. Das auf diese Weise erhaltene Bruzinsalz ist das Salz der Hexothymidindiphosphorsäure. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus 85%igem Alkohol ist es rein. Es kristallisiert in mikroskopischen Platten. Schmelzpunkt 172°. Es ist nur in heißem, verdünntem Alkohol und verdünntem Azeton löslich, in Wasser und anderen organischen Lösungsmitteln ist es nahezu unlöslich.

Hexothymidindiphosphorsäure.

```
H2        H    H    OH  OH  H
C---------C -- C -- C -- C -- C -- Thymin.
|         |     \   H    H   /
O         O      \          /
|  /OH    |  OH   \        /
P=O       P/ O      O
  \OH        \OH
```

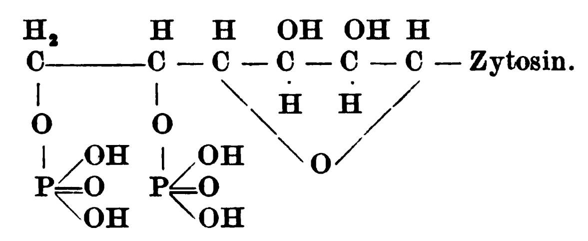
Die Hexothymidinphosphorsäure kristallisiert auch mit Bruzin zu einem sauren Salz. Dieses zeigt einen höheren Schmelzpunkt

und kristallisiert in Nadeln. Die Verwandlung des Bruzinsalzes in das Bariumsalz geschieht auf folgende Weise: Man suspendiert das Bariumsalz in Wasser in einem Scheidetrichter, gibt einen Überschuß von Ammoniak zu und schüttelt mehrere Male mit Chloroform aus. Die wässerige Lösung des Ammoniumsalzes gibt man in einen Destillierkolben, fügt einen Tropfen Phenolphthalein zu und destilliert im Vakuum. Der Aufnahmekolben bei der Vakuumdestillation wird vorher mit etwas verdünnter Schwefelsäure beschickt. Während der Vakuumdestillation gibt man aus einem Tropftrichter tropfenweise eine gesättigte Lösung reinen Bariumhydrates zu, bis die Lösung bei Fortsetzung der Destillation gerade alkalisch gegen Phenolphthalein bleibt. Das auf diese Weise schon bei den ersten Tropfen Baryumhydratzusatz ausfallende Bariumsalz wird durch einige Tropfen Essigsäure (ein Überschuß muß vermieden werden) wieder in Lösung gebracht. Hierauf wird die Lösung aufgekocht. Das Bariumsalz, welches unlöslicher in heißem als in kaltem Wasser ist, fällt als weißes Pulver aus, das unter dem Mikroskop als Konglomerat von Kugeln, in denen schwer Kristallformen zu erkennen sind, erscheint. Das Salz wird heiß filtriert, mit heißem Wasser gewaschen und dann mit Alkohol und Äther getrocknet. Es ist bereits rein für die Analyse. Wenn die stark essigsaure Lösung des Bariumsalzes auf dem Wasserbad langsam konzentriert wird, so scheidet sich allmählich eine weiße Kruste ab, die unter dem Mikroskop als ein Aggregat von farblosen Nadeln erscheint. Die optische Aktivität des Bariumsalzes in n/5-Salzsäurelösung ist $[\alpha]_D^{20} = + 10{\cdot}86^0$.

Die freie Hexothymidindiphosphorsäure kristallisiert nicht. Sie wird aus dem Bruzinsalz über das Quecksilber oder Bleisalz hergestellt.

Die Mutterlaugen bei der Darstellung des Bruzinsalzes der Hexothymidinphosphorsäure werden auf ein kleines Volumen gebracht. Beim Stehen fällt noch etwas vom Bruzinsalz der Hexothymidinphosphorsäure aus. Nach dem Abfiltrieren wird die Mutterlauge noch weiterhin eingeengt und mit absolutem Alkohol bis zum Auftreten einer bleibenden Trübung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen fällt das neutrale Bruzinsalz der Hexozytidindiphosphorsäure in langen Platten mit zugespitzten Enden aus. Es wird aus 95%igem Alkohol umkristallisiert und fällt nunmehr in langen Prismen aus. Nach 24 Stunden ist die Auskristallisation vollständig. Es ist leichter löslich in verdünntem und absolutem Alkohol als das entsprechende Salz der Hexozytidindiphosphorsäure.

Zytidindiphosphorsäure.



Das Bariumsalz der Hexozytidindiphosphorsäure wird in der oben beschriebenen Weise hergestellt. Es ist ebenso wie das Bariumsalz der Thymidinverbindung in heißem Wasser schwerer löslich als in kaltem Wasser. Die optische Aktivität des Bariumsalzes in $^1/_1$ n Salzsäure ist $+ 31 \cdot 45^0$.

Die freie Hexozytidindiphosphorsäure wird über ein Metallsalz aus dem Bruzinsalz gewonnen. Sie ist bisher nicht kristallisiert erhalten worden. Die beiden Zytidin- und Thymidinphosphorsäuren werden von Phosphorwolframsäure nur in 20 bis 25%iger schwefelsaurer Lösung gefällt. Eine Trennung von den Polynukleotiden, welche bereits in 10%iger schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure ausfallen, ist auf diese Weise möglich.



Isolierung von Purinbasen oder Alloxurkörpern aus Pflanzen.

Von E. **Winterstein**, Zürich.

Die spezifischen Purinbasen des Pflanzenreiches sind das Thein oder Koffein, das Theobromin und das Theophyllin; außerdem findet man in den meisten Pflanzen kleinere Mengen Xanthin und Hypoxanthin, Adenin und Guanin. In welchen Mengen Xanthin und Hypoxanthin primär in pflanzlichen Organen vorkommen, läßt sich nicht mit Bestimmtheit angeben, da bei der Isolierung die Purinkörper Veränderungen erleiden können. So fand *Krüger*[1]), daß die Teelauge höchstens Spuren von Hypoxanthin enthält, und er führt den von anderen Forschern gefundenen hohen Hypoxanthingehalt auf eine Umwandlung des Adenins durch die bei der Darstellung freiwerdende salpetrige Säure zurück. Die Purinbasen finden sich zum Teil frei, zum Teil bilden sie in Verbindung mit Phosphorsäure, Eiweiß und anderen Komplexen die Nukleinstoffe. Auch glykosidähnliche Stoffe dieser Basen sind bekannt, so z. B. das Vernin, welches bei der Spaltung mit Säuren Guanin liefert.

Die Purinbasen sind fällbar durch Phosphorwolframsäure, durch Merkurinitrat, durch Silbernitrat bei Anwesenheit von Ammoniak oder von Salpetersäure, und ferner werden sie beim Kochen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfat gefällt. Um eine Trennung der einzelnen Purinbasen herbeizuführen, benützt man das Verhalten der Silberdoppelverbindungen und andere Eigenschaften.

Nach *E. Schulze* und *E. Bosshard*[2]) verfährt man behufs Isolierung der Purinbasen wie folgt:

Die pflanzlichen Objekte werden mit heißem Wasser oder stark verdünntem Alkohol extrahiert; um eine möglichst vollständige Extraktion zu erzielen, kann man etwas verdünnte Mineralsäure zusetzen. Die Extrakte werden mit Bleiessig vollständig ausgefällt, wobei man einen Überschuß tunlichst vermeidet. Die von

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**. 275 (1896).

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. **9**. 420 (1885).

der Bleifällung getrennte Flüssigkeit wird mit Merkurinitrat ausgefällt. Die durch dieses Reagens hervorgebrachten weißen Niederschläge werden aufs Filter gebracht und mit kaltem Wasser ausgewaschen, sodann mit Wasser zu einem dünnen Brei verrührt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt.

Da durch Merkurinitrat auch Arginin, Glutamin und andere Stickstoffverbindungen ausgefällt werden, müssen die Purinbasen von den ersten mit Hilfe von Silbernitrat getrennt werden. Zu diesem Zweck dunstet man die vom Quecksilbersulfid getrennte Flüssigkeit vorsichtig auf dem Wasserbad ein, wobei man von Zeit zu Zeit die Flüssigkeit mit Ammonkarbonat versetzt bis neutrale Reaktion eingetreten ist. Die konzentrierte Lösung wird mit ammoniakalischem Silbernitrat versetzt, wobei eine gelatinöse, schwer filtrierbare Masse entsteht. Durch schwaches Erwärmen gelingt es, die Gallerte zu koagulieren.

Die für die Ausfällung erforderliche Silberlösung stellt man durch Versetzen einer mäßig konzentrierten Silbernitratlösung mit Ammoniak her, bis die entstandene braune Fällung sich eben gelöst hat. Ein großer Überschuß von Ammoniak ist zu vermeiden, da die Silberfällungen in Ammoniak in manchen Fällen zum Teil löslich sind.

Die Silberfällung wird mit Wasser sorgfältig ausgewaschen, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff oder Natriumsulfid zerlegt; rascher geschieht die Zerlegung mit verdünnter Salzsäure bei schwachem Erwärmen, man filtriert vom Chlorsilber ab, macht die Lösung, welche keinen großen Überschuß von Salzsäure enthalten soll, mit Ammonkarbonat schwach alkalisch und läßt längere Zeit stehen. Die Purinbasen scheiden sich dann oft als sandige, fein kristallinische Pulver aus.

Fällt man mit Silbernitrat in salpetersaurer Lösung, so ist die Fällung unvollständig. Wurden die Purinkörper mit ammoniakalischem Silbernitrat gefällt, so kann die Fällung eventuell Arginin und Histidin enthalten.

Man kann aber auch die Fällbarkeit der Alloxurbasen durch Phosphorwolframsäure benützen. Zu diesem Zwecke reinigt man die Pflanzenextrakte mit Bleiessig, fällt das Blei mit Schwefelsäure aus und fügt so viel konzentrierte Schwefelsäure hinzu, daß die Flüssigkeit 5% davon enthält, dann fällt man mit konzentrierter Lösung von Phosphorwolframsäure aus, bringt den Niederschlag nach 24 Stunden auf die Nutsche, wäscht mit 5%iger Schwefelsäure aus. Der Niederschlag wird nun mit Wasser fein verrieben und eine warmgesättigte Lösung von Bariumhydroxyd hinzugefügt oder vorsichtiger mit aufgeschlemmtem, fein zerriebenem Baryt versetzt, bis eine Probe des Filtrates mit Kohlensäure eine Fällung gibt; ist dies der Fall, so scheidet sich der Niederschlag rasch

von der Flüssigkeit. Die Lösung wird abgesaugt, der Rückstand gut ausgewaschen, von der Nutsche genommen, wieder mit Wasser gut durchgerührt und nochmals auf die Nutsche gebracht. Man entfernt nun den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure. Man kann aber auch den Baryt vor dem Abfiltrieren des Bariumwolframates ausfällen, wodurch eine Filtration erspart wird. Die Lösung, welche nur noch kleine Mengen Barium enthält, wird mit Salpetersäure neutralisiert und nur mit Silbernitrat gefällt, um die Anwesenheit von Ammoniak zu vermeiden, welches bei der weiteren Isolierung der Basen Arginin, Histidin, Lysin usw. störend wirkt. In diesem Falle aber ist die Ausfällung der Purinbasen eine unvollständige. Wir[1]) konnten z. B. nachweisen, daß bei Untersuchung der Extrakte vom Steinpilz das Adenin sich dann in der sogenannten Histidinfraktion vorfindet.

M. Krüger[2]) hat eine Methode ausgearbeitet, welche wesentlich billiger und bequemer ist. Sie beruht darauf, daß Purinkörper beim Kochen mit Kupferoxydul unlösliche schwere, sich rasch absetzende Fällungen liefern. Nach dem genannten Autor werden die Extrakte mit Kupfersulfat und Bisulfit im Überschuß gekocht, die entstandene Fällung nach dem Auswaschen zerlegt und die Lösung eingedunstet. Koffein und Theobromin werden dabei nicht gefällt. Über die weiteren Details und die Trennung der einzelnen Basen wird im folgenden berichtet.

Nach dieser und der vorher beschriebenen Methode lassen sich die Purinkörper leicht im reinen Zustand darstellen. Durch direkte Fällung von Pflanzenextrakten mit ammoniakalischem Silbernitrat gelingt es aber in vielen Fällen nicht, aus Pflanzensamen, etiolierten Keimpflanzen oder anderen pflanzlichen Organen die Purinkörper in reinem Zustand darzustellen, da solche Extrakte oft viel Kohlenhydrate und organische Säuren enthalten, welche eine Reduktion bewirken bezw. mitausgefällt werden. In unserem Laboratorium ist es uns nun gelungen, aus einem mit Hilfe von 95%igem Alkohol gewonnenen Extrakt von Boletus edulis durch Fällen mit Silbernitrat und Ammoniak, nach voraufgegangener Reinigung mit Bleiessig kleine Mengen von Purinkörper zu isolieren. Die Reindarstellung aber mußte dann mit Phosphorwolframsäure vorgenommen werden.

Auch die Methode von *Krüger* führte in diesem Falle nicht zu reinen Verbindungen, auch dann nicht, als die nach dem Zerlegen der Kupferoxydulfällung erhaltene Lösung, wie es *Krüger* angibt, nochmals mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt wurde. In

---

[1]) *C. Reuter*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **78**. 195 (1912).

[2]) *M. Krüger*: Die Gewinnung des Adenins aus Tee-Extrakt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**. 278 (1896).

allen Fällen aber ist es angezeigt, die Extrakte vorher mit Bleiessig zu reinigen, das Blei mit Schwefelsäure zu entfernen und die Lösung stark zu konzentrieren, eventuell bei Anwesenheit von viel freier Essigsäure zu neutralisieren und dann die Ausfällung mit den genannten Agentien vorzunehmen. Es folgen nun die Beschreibungen der Darstellung der wichtigsten Purinkörper des Pflanzenreiches und deren quantitative Bestimmung an einzelnen Beispielen.

Das Koffein, Thein 1.3.7-Trimethyl-2·6-dioxypurin $C_8 H_{10} O_2 N_4 + H_2 O$ bildet feine seidenglänzende Nadeln, welche erst gegen 180° das Wasser vollständig verlieren. Es sublimiert ohne Zersetzung und schmilzt bei 235°. Es wird durch Phosphorwolframsäure gefällt, nicht durch ammoniakalische Silberlösung und Kupferoxydul. Koffein ist leicht löslich in heißem Chloroform; in absolutem Alkohol, Schwefelkohlenstoff, Tetrachlorkohlenstoff, Petroläther und Benzol ist es schwer löslich. 100 *g* einer bei 25° gesättigten wässerigen Lösung enthalten 2·14 *g* Koffein. Es löst sich in zwei Teilen siedendem Wasser. Die wässerige Lösung reagiert neutral und ist inaktiv. Behufs Identifizierung bestimmt man den Schmelzpunkt und führt die Murexidprobe aus.

Aus Kaffee kann die Base wie folgt dargestellt werden: Die gemahlenen Bohnen werden mit Wasser dreimal ausgekocht, die Extrakte mit Bleiessig, unter Vermeidung eines Überschusses, ausgefällt, das vom Bleiniederschlag getrennte Filtrat mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und die vom Bleisulfid getrennte Lösung unter Zusatz von reiner Magnesia und etwas Sand zur Trockne eingedunstet, der Trockenrückstand im Soxhlet mit Chloroform extrahiert. Nach dem Verdampfen des Chloroforms bleibt das Koffein in nahezu reinem Zustand zurück. Man reinigt es durch Umkristallisieren aus Chloroform, Wasser oder Alkohol. Nach diesem Verfahren läßt sich das Koffein nahezu quantitativ abscheiden. Oder man bereitet sich einen Teig aus fünf Teilen gemahlenem Kaffee und einem Teil Magnesia, trocknet, pulverisiert das Gemisch und extrahiert mit Chloroform. Auch aus Teeblättern kann das Koffein nach den beschriebenen Methoden gewonnen werden.

Quantitative Bestimmung des Koffeins: Die zahlreichen Methoden zur Bestimmung des Koffeins lassen sich in drei große Gruppen teilen. Bei denjenigen der ersten Gruppe wird die Substanz zunächst mit heißem Wasser ausgezogen und dem erhaltenen Auszug das Koffein durch organische Lösungsmittel entzogen. Diejenigen der zweiten Gruppe beruhen auf einer Erschöpfung mit den Lösungen organischer Salze und nachfolgende Behandlung wie oben, und bei den Methoden der dritten Gruppe entzieht man

das Koffein dem trockenen oder feuchten Kaffee direkt mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff).

Im Vordergrunde des Interesses stehen die Methoden der dritten Gruppe.

Verfahren von *Lendrich* und *Nottbohm*[1]): Man versetzt 20 *g* des auf 1 *mm* Korngröße vermahlenen und gesiebten, rohen oder gerösteten Kaffees in einem Becherglase mit 10 *cm*³ Wasser, mischt sofort durch und läßt dann unter zeitweiligem Umrühren zwei Stunden (bei geröstetem Kaffee eine Stunde) stehen. Hierauf wird die Substanz verlustlos in eine *Schleicher*- und *Schüll*sche Extraktionshülse gebracht und drei Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff bei direkter Feuerung ausgezogen. Von dem Auszuge destilliert man nach Zusatz festen Paraffins den Tetrachlorkohlenstoff ab und zieht den Rückstand einmal mit 30 *cm*³ und darauf dreimal mit je 25 *cm*³ kochend heißem Wasser aus. Die abgekühlten Auszüge gießt man durch ein angefeuchtetes Filter, wäscht mit siedendem Wasser nach und vermischt das auf Zimmertemperatur abgekühlte Filtrat mit 10 *cm*³ (bei geröstetem Kaffee 30 *cm*³) 1%iger Permanganatlösung. Nach einviertelstündiger Einwirkung wird das Mangan durch tropfenweisen Zusatz einer 3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung, die in 100 *cm*³ 1 *cm*³ Eisessig enthält, abgeschieden, die Flüssigkeit darauf eine Viertelstunde auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, heiß filtriert und der Filterrückstand mit siedendem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat dampft man in einer Glasschale ein, trocknet den Rückstand eine Viertelstunde bei 100° und erschöpft ihn dann sofort mit warmem Chloroform. Der filtrierte Auszug wird vom Lösungsmittel befreit und das hinterbleibende Koffein nach halbstündigem Trocknen bei 100° gewogen.

Das Verfahren darf zurzeit als das beste bezeichnet werden[1]).

Verfahren von *J. Katz*[2]): 10 *g* der Droge werden mit 200 *cm*³ Chloroform und 10 *cm*³ 10%igem Ammoniak eine halbe Stunde geschüttelt. Nach dem Absetzen filtriert man durch ein *Sander*sches Zigarettenfilter, befreit 150 *cm*³ des Filtrates vom Chloroform und löst den Rückstand, wenn nötig durch kurzes Erwärmen am Rückflußkühler, in Äther. Nach Zusatz von 10 *cm*³ 0·5%iger Salzsäure und bei Kaffee 0·5 *g* festem Paraffin, verdunstet man den Äther und filtriert die wässerige Lösung nach dem Erkalten. Kölbchen und Filter werden mit kleinen Mengen 0·5%iger Salzsäure nachgewaschen. Das saure Filtrat erschöpft man entweder zwei Stunden lang mit Chloroform im Extraktionsapparat oder schüttelt es vier- bis fünfmal mit je 20 *cm*³ Chloroform aus. Die filtrierten Auszüge geben nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels bei Kaffee,

---

[1]) Handb. d. Nahrungsmittelunters. 1. 825 (1914).

[2]) Handb. d. Nahrungsmittelunters. 1. 826 (1914).

Tee, Guarana und Kola so reines Koffein, daß es nach dem Trocknen direkt gewogen werden kann.

Bei Paraguaytee muß die wässerige Flüssigkeit jedoch vor der Chloroformausschüttelung mit 2 *cm*³ einer Aufschwemmung von Bleihydroxyd in Wasser (1: 20) zehn Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt, darauf mit einigen Dezigramm gebrannter Magnesia versetzt werden. Die nach dem Erkalten filtrierte Lösung erschöpft man wie oben mit Chloroform.

Bei einer anderen Methode von *Lendrich* und *Nottbohm*[1]) extrahiert man die Droge zunächst mit Ammoniak. Man verfährt wie folgt: 20 *g* des fein gemahlenen Kaffees werden in einem Becherglase mit 10 *cm*³ 10%iger Ammoniaklösung versetzt, sofort durchgemischt und unter zeitweiligem Umrühren beim rohen Kaffee zwei Stunden, bei geröstetem Kaffee eine Stunde stehen gelassen. Hierauf wird das Pulver mit 20 bis 30 *g* grobkörnigem Quarzpulver gemischt, verlustlos in einen Extraktionsapparat gebracht und etwa drei Stunden lang mit Tetrachlorkohlenstoff, unter Erhitzung des Extraktionsapparates auf einem Drahtnetze, ausgezogen. Im übrigen verfährt man dann wie oben angegeben. Dieses Verfahren läßt sich mit sehr gutem Erfolge auch für die Bestimmung des Koffeins im Tee verwenden.

Nach *E. Philippe*[2]) kann Koffein quantitativ rasch und sicher mit Hilfe des Sublimierverfahrens bestimmt werden. Der Verfasser hat hiezu einen einfachen handlichen Apparat konstruiert. Nach den Angaben des Verfassers verfährt man beispielsweise folgendermaßen: In einem Scheidetrichter von etwa 0·5 *l* Inhalt gibt man 10 *cm*³ Ammoniakflüssigkeit, setzt dann 5 *g* fein gemahlenen Tee zu, schwenkt vorsichtig um, bis alles Teepulver benetzt ist und läßt einige Minuten stehen. Sodann wird viermal mit je 50 *cm*³ Chloroform während je drei Minuten geschüttelt und das Chloroform jeweils durch ein kleines Filter in einen Erlenmeyer abgelassen. Die vereinigten Filtrate werden aus dem heißen Wasserbade abdestilliert. Den Rückstand versetzt man mit etwa 120 *cm*³ Wasser und 20 *cm*³ n/10-Schwefelsäure und erhitzt auf freier Flamme bis zum Sieden, worauf heiß filtriert und mit heißem Wasser nachgewaschen wird. Das Filtrat kühlt man ab, bringt es unter Nachwaschen mit wenig Wasser in den inzwischen gereinigten Scheidetrichter, gibt 10 *cm*³ Ammoniakflüssigkeit und einige Tropfen

---

[1]) Eine Zusammenstellung verschiedener Methoden findet sich in dem Handbuch von *K. v. Buchka.* Das Lebensmittelgewerbe.

[2]) Ein neuer Sublimatapparat und einige damit gemachten Erfahrungen. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene Veröffentlichung vom Schweiz. Gesundheitsamt. **3.** 41 (1912); Über quantitatives Sublimieren. Ibid. **4.** 351 (1913); Ein neuer Sublimierapparat. Ibid. **3.** 41 (1912); Die Bestimmung des Koffeins in Tee nach dem Sublimierungsverfahren. Ibid. **6.** 177 (1915); **7.** 37 (1916).



Phenolphthalein zu und schüttelt wie zu Anfang wieder viermal mit Chloroform aus. Die filtrierten und vereinigten Auszüge werden durch Abdestillieren des Chloroforms auf ein kleines Volumen gebracht, unter Nachspülen mit wenigen Tropfen Chloroform in eine flache Glasschale ohne Ausguß gebracht, an der Wärme zur Trockne verdunstet und in dem hiezu konstruierten Apparat der Sublimation unterworfen.

Der Apparat besteht der Hauptsache nach aus einer zu Kühlzwecken dienenden, auf der Unterseite offenen Metallkapsel aus Nickelblech, deren Durchmesser 7 *cm* beträgt. Diese Kapsel wird mit ihrem unteren freien Rande unter Zwischenschaltung eines etwa 12 *mm* breiten und 6 bis 7 *mm* dicken Ringes aus weichem Gummi auf die konvexe Seite eines Uhrglases von 11 cm^3 Durchmesser aufgesetzt und mit Hilfe von ihn drei gleichmäßigen Abständen auf der Außenseite der Kapsel angebrachten Spiralfederhaken, welche sich am Rande des Uhrglases einhängen lassen, auf diesem befestigt. Durch den Deckel der Kapsel gehen zwei rechtwinkelig gebogene Röhren von etwa 8 *mm* Durchmesser, deren eine beinahe zum unteren Kapselrande reicht, während die andere etwa 1 *cm* nach ihrem Eintritt in das Kapselinnere endet. Mit Hilfe dieser beiden Röhren kann bei aufgesetzter Kapsel durch Wasserzirkulation eine starke Kühlung der durch den Kapselumfang begrenzten inneren Uhrglaszone bewerkstelligt werden, auf welcher die sublimierende Substanz sich ansetzt. Vermöge der Federspannung wird der untere Kapselrand auf den Gummiring und dieser wiederum auf das Uhrglas festgedrückt, so daß bei richtiger Montierung des Apparates ein vollkommener wasserdichter Verschluß entsteht. Als Sublimationsgefäß benützt man eine flache Glasschale mit abgeschliffenem Rand, deren Höhe etwa 3 *cm* beträgt und deren Durchmesser demjenigen der Metallkapsel gleichkommt oder etwas hinter diesem zurückbleibt, keinesfalls aber ihn übertrifft. Der Apparat wird nun mit dei konkaven Fläche des Uhrglases auf den Rand des Gefäßes aufgesetzt. Die Glasschale wird vor dem Aufsetzen der Sublimiervorrichtung auf einen Dreifuß mit doppeltem Drahtnetz gebracht; als Wärmequelle dient ein untergestellter Pilzbrenner, dessen Entfernung von den Drahtnetzen nach Bedarf zu regulieren ist. Das vorher tarierte Uhrglas wird nach Beendigung der Sublimation im Exsikkator getrocknet, um die kleine Menge Wasser, die sich auf der gekühlten Uhrglasfläche angesammelt hat, zu entfernen. Der sublimierende Körper setzt sich, bei richtigem Vorgehen, in der Mitte des Glases an. Die Dauer der Sublimation beträgt zirka eine Stunde. Bei den angegebenen Größenverhältnissen des Apparates sollte das Gewicht des Sublimates im allgemeinen 0·15 *g* nicht übersteigen.

Theobromin $C_7H_8O_2N_4$, 3·7-Dimethyl-2·6-dioxypurin bildet weiße mikroskopische, bitterschmeckende Kristalle, die kein Wasser enthalten. Es sublimiert bei 290 bis 295° ohne zu schmelzen. In Äther und Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und Ligroin nahezu unlöslich. 1 Teil löst sich in 148 Teilen Wasser von 100°, in kaltem Wasser, auch in absolutem Alkohol ist es schwer löslich. Es löst sich leicht in Trialkaliphosphaten, Alkalisilikaten, weniger in Natriumkarbonat und Natriumborat. Es wird durch Phosphorwolframsäure und durch ammoniakalische Silberlösung, aber nicht durch Kupferoxydul gefällt.

Das Theobromin wird am besten aus entfetteten Kakao. bohnen nach den bei Koffein angegebenen Verfahren gewonnen. Nach *Decker*[1]) empfiehlt es sich, die gepulverten Bohnen mit der halben Menge Magnesia und der 30fachen Menge Wasser eine Stunde am Rückflußkühler zu kochen, dann zu filtrieren, einzudunsten und den Rückstand mit Chloroform auszukochen. Man trennt das in Lösung gegangene Koffein mit Hilfe von Tetrachlorkohlenstoff. Entfettete Kakaobohnen werden mit fein gepulvertem, frisch bereitetem Kalziumhydroxyd gemengt und die Masse wiederholt mit 80%igem Alkohol ausgekocht; aus der konzentrierten Lösung scheidet sich ein großer Teil des Theobromins nahezu rein aus[2]).

Theophyllin $C_7H_8O_2N_4 + H_2O$ 1·3-Dimethyl-2·6-dioxypurin bildet deutlich makroskopisch sichtbare Kristalle, dünne Tafeln des monosymmetrischen Systems. Es schmilzt bei 264°. Im kalten Wasser ist es wenig löslich, bei 15° in 226 Teilen, in warmem Wasser ist es viel leichter löslich; auch verdünntes Ammoniak löst es auf. Es ist im kalten Alkohol und Äther schwer löslich.

Theophyllin wird durch Phosphorwolframsäure und durch ammoniakalisches Silbernitrat gefällt. Dampft man Theophyllin mit starker Salpetersäure ein, so bleibt ein gelber Rückstand, der auf Zusatz von Lauge dunkler gelb, aber nicht rot wird wie beim Xanthin. Dampft man die Base mit Bromwasser ein, so hinterbleibt ein scharlachroter Rückstand, der sich mit Ammoniak violett färbt; auf Zusatz von Natronlauge tritt Entfärbung ein. Dieses Verhalten zeigt auch Theobromin.

Nach *Kossel*[3]) wird das Theophyllin folgendermaßen dargestellt: Tee-Extrakt wird mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, man rührt tüchtig durch, wobei die harzige Ausfällung sich zusammenballt, nach einiger Zeit filtriert man ab. Man macht das Filtrat mit Ammoniak schwach alkalisch und fällt mit ammoniakalischem Silbernitrat aus. Die entstandene Fällung wird nach 24 Stunden

---

[1]) Rec. trav. chim. P. B. T. **22**. 142 (1903).

[2]) *Schmidt* und *Pressler*: Ann. d. Chem. u. Pharm. **217**. 288 (1883).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 298 (1889).

von der Flüssigkeit durch Filtration getrennt, ausgewaschen und mit warmer Salpetersäure digeriert. Beim Erkalten scheidet sich die Silberverbindung des Adenins und Hypoxanthins aus; man filtriert und fügt zu dem Filtrat Ammoniak, wobei Xanthin und Theophyllin als Silberverbindungen gefällt werden. Die abfiltrierte und ausgewaschene Fällung wird in schwach salpetersaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der eingedunsteten Lösung scheidet sich zunächst das Xanthin ab, das Filtrat hievon wird weiter konzentriert und liefert beim Stehen einen Teil des Theophyllins. Aus der Mutterlauge wird der Rest in folgender Weise gewonnen: Die saure Lösung wird mit Merkurinitrat versetzt, der dunkle Niederschlag entfernt und das Filtrat davon mit Soda versetzt, bis die Reaktion nur noch schwach sauer ist, dann wird mehr Merkurinitrat und Soda hinzugefügt, solange noch ein weißer Niederschlag in schwach saurer Lösung entsteht. Die weiße Fällung wird auf der Nutsche ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die vom Quecksilbersulfid getrennte Lösung eingedunstet. Das Theophyllin scheidet sich in nahezu farblosen Kristallen aus. Das Filtrat vom Quecksilberniederschlag enthält noch kleine Mengen der Base, welche durch Ausfällen mit ammoniakalischem Silbernitrat gewonnen werden können.

Adenin[1]), 6-Aminopurin $C_5 H_5 N_5 + 3 H_2 O$. Aus verdünnten kalten Lösungen kristallisiert Adenin in langen Nadeln, die drei Moleküle Wasser enthalten; aus warmen unreinen Lösungen amorph oder in mikroskopisch büschelförmig gruppierten Kristallen. Aus heißem Wasser umkristallisiert bilden sich vierseitige Pyramiden. Die Kristalle werden an der Luft bald undurchsichtig. Suspendiert man die Kristalle in einer Spur Wasser von 53°, so tritt die Trübung sofort ein. Diese Eigenschaft kann zum Nachweis des Adenins dienen; auch beim Übergießen mit Säuren werden die Kristalle rasch undurchsichtig. Bei 110° entweicht das Kristallwasser vollständig. Adenin sublimiert bei 220° unzersetzt. Beim raschen Erhitzen in der Kapillare schmilzt es unter Zersetzung bei 360 bis 365°. Die wässerigen Lösungen des Adenins reagieren neutral. Es löst sich in 1086 Teilen kaltem Wasser; in kochendem ist es leicht löslich. Es ist unlöslich in Äther, Chloroform, etwas löslich in heißem Alkohol, leicht löslich in Mineralsalzen und Alkalien.

Adenin gibt mit ammoniakalischem Silbernitrat einen gallertartigen Niederschlag von Adeninsilber $C_5 H_3 Ag_2 N_5 + H_2 O$. Beim Kochen einer Lösung von Adenin mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit entsteht unlösliches Adeninkupferoxydul $C_5 H_5 N_5 Cu_2 O$. Adenin wird gefällt durch Kaliumwismutjodid, Quecksilbernitrat,

---

[1]) *A. Kossel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **10.** 252 (1886); ibid. **12.** 241 (1888); *M. Krüger*: Ibid. **10.** 160 (1892).

durch Merkurisulfat in saurer Lösung auch Platin- und Goldchlorid erzeugen Fällungen.

Adeninpikrat $C_5 H_5 N_5 C_6 H_3 N_3 O_7 + H_2 O$ sehr schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol. Zersetzungspunkt 279 bis 281°.

Adeninpikrolonat $C_5 H_5 N_5 C_{10} H_8 N_4 O_5$ Schmelzpunkt 265°.

Das Adenin bildet mit Theobromin eine merkwürdige Doppelbase[1]), welche ebenso wie das Theobromin nicht durch Kupfersulfat und Bisulfit, wohl aber durch ammoniakalisches Silbernitrat gefällt werden kann, diese Fällung ist leicht löslich in Ammoniak.

Darstellung des Adenins: 1 *l* Tee-Extrakt wird mit Wasser auf das Fünffache verdünnt und zur Ausfällung der Humussubstanzen mit einem halben Liter Schwefelsäure (1 Teil reiner $H_2 SO_4$ und 5 Teile $H_2 O$) versetzt. Die Fällung wird nach einiger Zeit entfernt. Das Filtrat wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit ammoniakalischem Silbernitrat ausgefällt; die außerordentlich voluminöse Fällung wird durch Faltenfilter filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen, bis die Flüssigkeit nur noch gelb gefärbt ist. Die feuchten Niederschläge werden in einem Becherglas mit Wasser verrieben und die nötige Menge Salzsäure hinzugefügt. Nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbade ist die Zersetzung beendet. Das stark saure Filtrat wird mit Natronlauge neutralisiert und mit Tierkohle entfärbt und eingedampft. Der entstandene Kristallbrei wird nach einigem Stehen von der Flüssigkeit durch Absaugen getrennt und mit Wasser gewaschen. Durch Umkristallisieren wird es rein erhalten.

Anstatt Silbernitrat und Ammoniak kann man auch Kupferoxydul zum Ausfällen benützen. Man reinigt zunächst mit verdünnter Schwefelsäure wie angegeben, neutralisiert das von Huminsubstanzen getrennte Filtrat mit Natronlauge, erhitzt zum Sieden und fügt Kupfersulfat und Natriumbisulfit bis zum Überschuß hinzu. Der Kupferoxydulniederschlag wird in heißem Wasser suspendiert, mit farblosem Natriumsulfid in geringem Überschuß zersetzt. Behufs weiterer Reinigung ist es oft angezeigt, die Base nochmals mit Kupfersulfat und Bisulfit auszufällen. Der gut ausgewaschene Niederschlag wird mit farblosem Ammonsulfid zersetzt und das Filtrat zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wird unter Zusatz von wenig Ammonkarbonat mit Wasser aufgekocht und stehen gelassen, dann wird die Fällung gesammelt und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Diese Methode ist viel billiger und wesentlich bequemer, da die Kupferoxydulfällungen in der Wärme sich flockig ausscheiden und leicht filtrierbar sind.

Behufs Trennung des Adenins vom oft vorhandenen Hypoxanthin benützt man Pikrinsäure[2]).

[1]) *M. Krüger*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**. 278 (1895).

[2]) *A. Ch. Chapman*: Journ. Chem. Soc. London. **105**. 1895 (1914).



Stoltzenberg[1]) hat aus Melasse durch Fällen mit Quecksilberazetat Adenin erhalten. Melasse wird stark mit Wasser verdünnt, mit Bleiessig gereinigt und das Filtrat mit 33%igem Quecksilberazetat gefällt, ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

K. Andrlik[2]) hat aus Melasseabfallaugen das Adenin durch Kochen mit Kupfersulfat und Alkali abgeschieden. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt; beim Eindampfen der Lösung kristallisiert der größte Teil des Adenins aus. Das in den Mutterlaugen verbliebene wird durch Pikrinsäure ausgefällt.

Zur Wiedergewinnung des Adenins aus dem Pikrat verfährt man nach *J. D. Barnett* und *W. Jones*[3]) in folgender Weise: Das Pikrat wird in 10%igem Ammoniak gelöst und mit einer Lösung von Silberchlorid in Ammoniak behandelt, die gelatinöse Fällung abfiltriert, in heißem Wasser suspendiert, mit Salzsäure zersetzt und die Lösung vom Chlorsilber abfiltriert. Man schüttelt die salzsaure Adeninlösung mit etwas Äther aus, neutralisiert mit Natronlauge, fällt das Adenin mit Kupfersulfat und Bisulfit aus und zersetzt die Fällung mit Schwefelwasserstoff, dampft das Filtrat vom Schwefelkupfer ein und kristallisiert aus heißer 5%iger Schwefelsäure um[4])

Trennung der Alloxurbasen.

Nach *Krüger* und *Salomon*[5]).

Diese Methode der Trennung der Alloxurkörper des Harnes dürfte sich auch für die Trennung der in den Pflanzen vorhandenen Purinbasen eignen. Sie sei daher hier kurz erwähnt. Sind die Alloxurbasen durch ammoniakalische Silberlösung gefällt worden, so wird der gewaschene Niederschlag in einem im siedenden Wasserbade befindlichen Rundkolben durch verdünnte Salzsäure zersetzt, bis die voluminöse Silberverbindung verschwunden ist; dann erhitzt man auf freier Flamme, gibt die gleiche Menge der vorher verbrauchten Salzsäure hinzu, filtriert heiß und wäscht den Niederschlag mit stark verdünnter Salzsäure aus.

Hat man die Alloxurbasen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt, so wird der mit heißem Wasser gewaschene Niederschlag ebenfalls im Rundkolben mit Wasser erwärmt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, dann mit Salzsäure schwach angesäuert, Schwefelwasserstoff eingeleitet und die Lösung heiß filtriert.

---

[1]) Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. **1912**. 318.

[2]) Zeitschr. f. Zuckerind. in Böhmen. **34**. 567 (1910).

[3]) Journ. of Biol. Chem. **9**. 93 (1911).

[4]) Das Pikrat kann auch mit starker Salzsäure zerlegt und die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Äther entfernt werden.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 373 (1898).

Das salzsaure Filtrat wird durch wenig Tierkohle entfärbt. Die Lösung wird nun auf dem Wasserbade bei gelinder Temperatur eingedunstet. Man befördert das Eindunsten durch Darüberleiten eines kräftigen Luftstromes. Um die Salzsäure möglichst zu entfernen, dunstet man noch zweimal mit Wasser zuletzt unter Zusatz von Alkohol ein. Der Verdampfungsrückstand wird sodann mit Wasser bei 40° digeriert, nach mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther getrocknet. Aus den Filtraten kann man durch nochmaliges Konzentrieren eine kleine Menge Basen erhalten, welche mit den ersten vereinigt werden. Der ungelöste Teil enthält das Xanthin und Heteroxanthin, in die wässerige Lösung gehen über: Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin.

Trennung der ersten Fraktion, der sogenannten Xanthinfraktion: Das Gemenge der Basen wird in der 15fachen Menge 33%iger, chloridfreier Natronlauge heiß gelöst. Innerhalb 24 Stunden scheidet sich das Natriumsalz des Heteroxanthins in reinem Zustand fast vollständig aus. Je 60 cm^3 des auf 60° erwärmten Filtrates werden in ein kaltes Gemisch von 20 cm^3 konzentrierter Salpetersäure und 20 cm^3 Wasser langsam unter Umrühren eingetragen; innerhalb mehrerer Stunden scheidet sich beim Stehen in der Kälte salpetersaures Xanthin aus. Um es zu reinigen, löst man in wenig Natronlauge und fällt wieder bei 60° mit Salpetersäure aus. Zur Darstellung des freien Xanthins wird die ammoniakalische Lösung des Nitrats eingedampft, wobei sich die Base in amorphen Krusten abscheidet.

Trennung der zweiten, der Hypoxanthinfraktion. Die salzsaure, vom Xanthin und Heteroxanthin getrennte Lösung wird mit Ammoniak in geringem Überschuß versetzt, wobei Epiguanin sich in kleinen glänzenden Prismen ausscheidet. Das Filtrat wird durch Erhitzen vom Ammoniak befreit und die nicht zu konzentrierte Lösung in der Kälte vorsichtig mit 1·1%iger Pikrinsäurelösung in geringem Überschuß versetzt und das ausgeschiedene Adeninpikrat sofort abgesogen. Man versetzt das Filtrat mit Schwefelsäure und schüttelt die Pikrinsäure mit Benzol aus, nun fällt man die noch vorhandenen Basen durch ammoniakalische Silberlösung oder durch Kupfersulfat und Bisulfit wieder aus, zersetzt die Fällung mit Schwefelwasserstoff und dampft ein. Man löst den trockenen Rückstand in der 33fachen Menge heißer verdünnter Salpetersäure (90 cm^3 Wasser und 10 cm^3 konzentrierter Salpetersäure). Beim Erkalten scheidet sich Hypoxanthinnitrat in reinem Zustand aus.

Das Filtrat enthält noch etwas Hypoxanthin, Heteroxanthin und das Paraxanthin; um letzteres zu isolieren, fällt man nochmals als Silber- oder Kupferoxydulverbindung, aus der Fällung

werden die Basen wie angegeben isoliert. Man dampft die salzsaure Lösung ein und behandelt den Rückstand mit wenig Wasser, dabei geht das Paraxanthin nebst dem Hypoxanthin in Lösung. (Man fällt eventuell nochmals als Silber- oder Kupferoxydulverbindung.) Sodann kristallisiert man das Gemisch der beiden Basen aus verdünnter Salpetersäure um und scheidet aus der Mutterlauge vom Hypoxanthin das Paraxanthin als Natriumsalz in der Kälte aus.

Ist Guanidin vorhanden, so geht dieses in beide Fraktionen. Um es aus der Xanthinfraktion zu erhalten, wird diese mit Ammoniak behandelt, wobei Guanidin ungelöst bleibt. In der Hypoxanthinfraktion findet es sich neben dem Epiguanin und kann von letzterem durch Behandeln mit heißem Wasser oder heißem verdünntem Ammoniak getrennt werden.

Im Zusammenhang sei noch das Allantoin, Vernin und Vizin behandelt.

Allantoin $C_4 H_6 O_3 N_4$ bildet glänzende, durchsichtige, sechsseitige, kleine Prismen mit hexagonaler Grundform. Es reagiert auf Lackmus neutral. Ist optisch inaktiv. Schmilzt unter Zersetzung bei 231°. In kaltem Wasser ist es schwer löslich, 1:186 bei 22°, unlöslich in kaltem absoluten Alkohol und Äther. Leicht löslich in Laugen und Alkalikarbonaten. Es löst sich leicht in Wasserstoffsuperoxyd ohne Veränderung auf. Diese Eigenschaft kann zum Reinigen des Allantoins benützt werden. Phosphorwolframsäure erzeugt keine Fällung, zum Unterschied von Purinen. Konzentrierte Lösungen geben mit ammoniakalischem Silbernitrat eine Fällung, leicht löslich in Ammoniak. Merkurinitrat und Quecksilberazetat fällen es aus. Allantoin reduziert *Fehling*sche Lösung. Mit Pepton bei Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure entsteht eine violette Färbung, wie Glyoxylsäure und Pepton bezw. Eiweißkörper: Tryptophanreaktion. Ein Kristall von Allantoin gibt mit einer wässerigen Lösung von Furfuraldehyd bei Gegenwart einiger Tropfen konzentrierter Salzsäure eine violette Färbung[1]). Kocht man Allantoin mit 12%iger Natronlauge, so zerfällt es in Ammoniak, Kohlensäure, Essigsäure und Oxalsäure, deren Nachweis zur Identifizierung des Allantoins dienen kann.

Allantoin ist in vielen Pflanzen nachgewiesen worden. Siehe die Arbeiten von *K. Stieger*[2]), *F. B. Power* und *A. H. Solway*[3]), *Titterbey*[4]), *H. Ackroyd*[5]), *K. Funk*[6]).

---

[1]) *Schiff*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **10**. 773 (1877).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 245 (1913).
[3]) The Welcome Chemical Researches Labor. Pharm. Journ. **1913**.
[4]) Pharm. Journ. **88**. 92 (1912).
[5]) Biochem. Journ. **5**. 405 (1911).
[6]) Journ. of Physiol. **45**. 75 (1911).

Behufs Darstellung bezw. für die quantitative Bestimmung des Allantoins benützt man die Fällbarkeit mit Merkurinitrat oder Merkuriazetat bei Gegenwart von viel Natriumazetat[1]).

Darstellung[2]): Die mit Hilfe von Wasser oder verdünntem Alkohol erhaltenen Pflanzenextrakte reinigt man mit Bleiessig und fällt die vom Bleiniederschlag getrennte Flüssigkeit mit Merkurinitrat aus. Der gut ausgewaschene Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber getrennte Flüssigkeit wird mit Ammoniak neutralisiert und die neutrale Lösung bei gelinder Wärme eingedunstet. Die Lösung enthält das Allantoin neben Asparagin. Um beide Körper voneinander zu trennen, sättigt man diese Lösung in der Hitze mit Kupferhydroxyd und läßt erkalten, wobei sich das Asparagin als Kupfersalz ausscheidet; man filtriert davon ab und befreit das Filtrat mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom Kupfer, dunstet die Lösung ein; das Allantoin kristallisiert alsbald aus. Zuweilen kann auch Allantoin zusammen mit Asparagin auskristallisieren; man trennt dann beide durch Umkristallisieren. Das Asparagin ist leichter löslich als das Allantoin.

Quantitative Bestimmung des Allantoins[2]). Die Extrakte werden mit Bleiessig gereinigt, zum Filtrat davon Phosphorwolframsäure hinzugefügt und mit einer konzentrierten Lösung von Merkuriazetat gefällt; die ausgewaschene Fällung mit Schwefelwasserstoff zerlegt, eingedunstet und die Kristalle gewogen. Eine Bestimmung des Stickstoffes in der Fällung gibt zu hohe Werte.

Das Vernin $C_{10} H_{13} O_5 N_5$, von *E. Schulze* und *E. Bosshard*[3]) in Pflanzen aufgefundene Substanz, ist mit dem Guanosin identisch[4]).

Das Vernin kristallisiert mit zwei Mol. Wasser dünne Nadeln oder flache Prismen. Die abgepreßten Kristalle bilden eine atlasglänzende Masse. In kaltem Wasser wenig löslich, leicht in heißem. Unlöslich in Alkohol. Löslich in Alkalien und verdünnten Mineralsäuren. Wird aus der alkalischen Lösung durch verdünnte Essigsäure als Gallerte gefällt, kristallisiert aber bald. Dreht in n/10-NaOH in 2%iger Lösung, $(\alpha)_D^{20} = -60^0$. Sintert und zersetzt sich unter Verkohlung gegen 240°. Reduziert *Fehling*sche Lösung nicht. Gibt mit Phlorogluzin und Salzsäure die Pentosenreaktion (kirschrote Färbung). Wird in saurer Lösung durch Phosphorwolframsäure gefällt; ebenso durch Merkurinitrat. Vernin gibt die Mur-

[1]) *Löwi*: Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **44**. 19 (1900); *Wiechowski*: Biochem. Zeitschr. **19**. 372 (1909); **25**. 446 (1910).

[2]) *Wiechowski*: Biochem. Zeitschr. **19**. 372 (1909); **25**. 446 (1910).

[3]) *E. Schulze* und *E. Bosshard*: Zur Kenntnis des Vorkommens von Allantoin, Asparagin usw. in den Pflanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**. 420 (1885); **10**. 80 (1886).

[4]) *E. Schulze* und *G. Trier*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 143 (1910).

exidreaktion. Silbernitrat erzeugt eine gallertartige, in Ammoniak lösliche Fällung. Das Verninpikrat bildet kugelige Aggregate, Büschel feiner Nadeln. Schmelzpunkt unter Zersetzung 185°. Beim Kochen mit 1%iger Schwefelsäure entsteht Guanin und d-Ribose.

Das Vernin ist in freiem Zustand in vielen Pflanzen, in unreifen und reifen Samen, in Blütenstaub, in Pilzen, in tierischen Organen gefunden worden[1]).

Das Guanosin aus Melasse ist mit dem Vernin identisch[2]).

D a r s t e l l u n g. Die getrockneten und zerriebenen Pflanzen werden mit Wasser extrahiert, die Extrakte mit Bleiessig gereinigt, die vom Bleiniederschlag getrennte Lösung mit Merkurinitrat ausgefällt. Der dadurch hervorgebrachte Niederschlag wird mit kaltem Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber getrennte Lösung wird mit Ammoniak neutralisiert und vorsichtig konzentriert. Nach dem Erkalten scheidet sich zuweilen eine Gallerte aus, welche kleinere Mengen von Asparaginkristallen einschließt. Die Ausscheidung wird auf einem Filter gesammelt, mit kaltem Wasser oder verdünntem Weingeist ausgewaschen. Um die beigemengten Asparaginkristalle abzutrennen, kristallisiert man das Rohprodukt aus Wasser um, wobei das Vernin infolge der schweren Löslichkeit sich zuerst ausscheidet. Eventuell kann man die Fällbarkeit des Vernins durch Silbernitrat zur Trennung vom Asparagin benützen. Sind dem Vernin Alloxurbasen beigemengt, so können diese durch Ausfällen mit Silbernitrat und Ammoniak entfernt werden, da die Silberverbindung des Vernins in Ammoniak leicht löslich ist.

V i z i n[3]) besitzt nach *Ritthausen* eine auf die Formel $C_8 H_{15} O_6 N_3$ stimmende Zusammensetzung, welche man nach *E. Schulze* und *G. Trier*[4]) in die Formel $C_{20} H_{36} O_{15} N_8$ bringen kann. Das Vizin kristallisiert in voluminösen fächerartigen Büscheln völlig weißer, feiner Nadeln.

1 Teil Vizin löst sich in 10 Teilen Wasser bei 22°. In kaltem absoluten Alkohol ist es nahezu unlöslich. In fixen Laugen ist es leicht und ohne Zersetzung löslich, weniger leicht in Ammoniak. Aus diesen Lösungen scheidet es sich beim Neutralisieren aus.

Wird Vizin kurze Zeit mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure erwärmt und darauf einige Tropfen Ferrichloridlösung und Ammoniak hinzugefügt, so tritt eine tiefblaue Farbe auf, die allmählich einen grauen Ton annimmt. Fügt man zu obiger Lösung

[1]) *E. Schulze*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 128 (1910).

[2]) *E. Schulze* und *G. Trier*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 143 (1910); siehe auch *Smolenski*: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 791 (1912).

[3]) *H. Ritthausen*: Journ. f. prakt. Chem. (2.) **2**. 336, 1070; (2.) **7**. 374 1877); **29**. 202 (1881); **59**. 480 (1899).

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 150 (1910).

Baryt im geringen Überschuß hinzu, so tritt eine rosarote Färbung auf, die beim Kochen verschwindet.

Kocht man Vizin zirka eine halbe Stunde mit 6 bis 10%iger Schwefelsäure, so entstehen 6·1% Zucker, berechnet als Glukose; befreit man die Lösung mit Baryt von der Schwefelsäure und dunstet ganz vorsichtig ein, so treten obige Farbenerscheinungen mit Eisenchlorid und Ammoniak bezw. mit Baryt nicht mehr auf. Die Lösung enthält das Sulfat einer Base, die durch die bekannten Alkaloidfällungsmittel niedergeschlagen wird; sie enthält daneben noch etwas Ammoniak, aber kein Divizin[1]). (Siehe *Ritthausen* loc. cit. weiter unten.)

Das Vizin wird durch vierstündiges Kochen mit kalt gesättigter Barytlösung nicht verändert. Mit Kalilauge tritt Ammoniak auf. Mit schmelzendem Kalihydrat entsteht Zyankalium. Das Vizin bildet voluminöse, zu Fächern vereinigte Büschel. Es schmilzt nach *Ritthausen* bei 180° unter Zersetzung. Der Verfasser dieses Aufsatzes fand den Zersetzungspunkt verschiedener Präparate bei raschem Erhitzen von 239 bis 242°[1]).

Das Vizin ist optisch aktiv[2]). $(\alpha)_D$ in 10%iger Schwefelsäure = — 8·77° in $^1/_5$ normaler Natronlauge $(\alpha)_D$ = — 12·1°.

Das Vizin bildet mit Schwefelsäure und Salzsäure gut definierte, in Alkohol schwer lösliche Salze.

Wird Vizin mit einem Gemisch von 17 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 5 Teilen Wasser einige Zeit im Wasserbade erhitzt, so erfolgt eine Ausscheidung von Kristallen in einer Menge von zirka 30%. Beim Erhitzen mit 10%iger Säure ist die Ausbeute davon geringer.

Diese Kristalle, große gutausgebildete, rosettenartig verbundene gelbe Prismen, sind das Sulfat einer von *Ritthausen* mit dem Namen Divizin benannten Base.

Die Base kann aus dem Sulfat mit den berechneten Mengen Kalilauge abgeschieden werden.

Das Divizin ist unbeständig, beim Umkristallisieren geht ein Teil verloren. Es löst sich in kochendem Wasser 1:100, in kaltem 1:350. Es ist leicht löslich in verdünnter Lauge. Mit Salpetersäure bildet die Base ein schwer lösliches, in wetzsteinförmigen Kristallen ausgebildetes Nitrat. Mit Eisenchlorid und Ammoniak entsteht eine tiefblaue Lösung. Wässerige Lösungen von Divizin wirken stark reduzierend. Sublimat gibt sofort Kalomel. Silbernitrat in Ammoniak wird reduziert. Phosphormolybdänsäure wird blau, Phosphorwolframsäure grün. Dem Divizin kommt die Formel

[1]) Nach Untersuchung des Verfassers. *P. A. Levene*: Journ. of Biol. Chem. **18**. 308 (1914). **25**. 607 (1916).

[2]) *E. Winterstein*: Zeitschr. f. phys. Chem. **105**. 258 (1919).

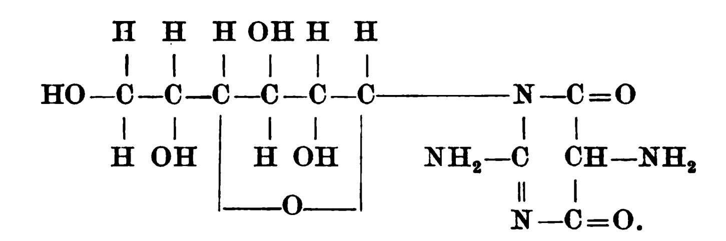


$C_4H_8O_2N_4$ zu. Das Divizin wird durch eine Reihe von Alkaloidfällungsmitteln gefällt.

B. Johnson[1]) hatte vermutet, daß das Divizin mit dem von Traube dargestellten 2·6-Dioxy-4·5-diaminopyrimidin (4·5-)Diaminourazil) identisch ist. Nach *E. Fischer*[2]) besteht allerdings eine große Ähnlichkeit, es ist aber damit nicht identisch: Die *Traube*sche Verbindung gibt beim Erhitzen mit Harnstoff auf 180° Harnsäure, Divizin liefert unter gleichen Versuchsbedingungen keine Harnsäure. Auch das Sulfat der *Traube*schen Base stimmt mit Divizinsulfat nicht überein.

Das Vizin liefert bei der Spaltung mit normaler Schwefelsäure in der Wärme ein Molekül d-Glukose[3]).

Nach *P. A. Levene*[4]) soll das Divizin 4·6-Dioxy-2·5-diaminopyrimidin sein. Demnach hat das Vicin folgende Konstitution:



Konvizin[5]) $C_{10}H_{15}O_8N_3H_2O$ kristallisiert aus den Mutterlaugen vom Vizin allmählich aus und wird durch Behandeln mit verdünnter Schwefelsäure vom noch beigemengten Vizin getrennt, in welch letzterer das Konvizin nur wenig löslich ist.

Das Konvizin kristallisiert in dünnen rhombischen, glänzenden, farblosen Blättchen, die an Leuzin erinnern. Es ist in kaltem Wasser nur in geringer Menge löslich; diese Lösung reagiert sauer. Von kalter Kalilauge wird es unverändert gelöst; mit schmelzenden Alkalien entsteht kein Zyanid.

Die wässerige Konvizinlösung gibt mit Merkurinitrat eine Fällung.

---

1) Journ. Amer. Soc. **36**. 337, 545 (1914).

2) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 2611 (1914).

3) *E. Winterstein*: Zeitschr. f. phys. Chem. **105**. 258 (1919); *Levene*: loc. cit. *E. Fischer*: loc. cit.

4) Journ. of Biol. Chem. **18**. 305 (1914).

5) *Ritthausen*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **29**. 894 (1896); Journ. f. prakt. Chem. (2.) **24**. 219 (1881); **59**. 487 (1889).

Mit verdünnter Schwefelsäure kurze Zeit erhitzt, scheiden sich allmählich Kristalle aus, die in ihrem Verhalten als Alloxantin erkannt wurden. Sie geben mit Barytwasser einen veilchenblauen Niederschlag, mit Eisenchlorid und Ammoniak eine tiefblaue Lösung, reduzieren Silbernitrat; mit Salpetersäure eingedunstet und mit Ammoniak befeuchtet, tritt eine purpurfarbene Lösung ein. Daneben entsteht ein Zucker.

Nach *B. Johnson*[1]) ist das Konvizin vielleicht ein Aminoglukosid der Dialursäure oder ein Uramilglukosid. Die entstandene Dialursäure könnte durch spontane Oxydation in Alloxantin übergehen.

Darstellung[2]). Fein gepulverte Samen von Vicia sativa (Wicken) werden mit 85%igem Alkohol wiederholt ausgekocht, die weingeistigen Lösungen bis auf zirka ein Achtel des Volumens abdestilliert, die Destillationsrückstände mit größeren Mengen Äther (zur Entfernung des Fettes) mehrfach ausgeschüttelt und der Ruhe überlassen, wobei ein großer Teil des Vizins auskristallisiert; die von der kristallinischen Ausscheidung abfiltrierte bräunliche Mutterlauge enthält jedoch noch erhebliche Mengen davon und sie sind daraus nur durch Fällen mit $HgCl_2$ und Kalilauge zu gewinnen, indem man dann die Quecksilberdoppelverbindung nach gründlichem Auswaschen mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

Da Vizin sich in verdünnten Mineralsäuren leicht auflöst, kann es auch nach folgendem Verfahren gewonnen werden: 1 *kg* Wickenpulver wird mit Wasser unter Zusatz von 20 *g* konzentrierter Schwefelsäure pro Liter zu einem dünnen Brei gemischt, welcher unter öfterem Durchmischen zirka 12 Stunden stehen bleibt; die Flüssigkeit wird vom unlöslichen Rückstand vollständig getrennt und die Lösung mit Kalziumhydroxyd alkalisch gemacht, der ausgeschiedene Gips abfiltriert und das Filtrat davon zum Sirup eingedunstet; dieser wiederum mit 85%igem Weingeist ausgekocht. Aus der alkoholischen Lösung werden 2·37 *g* fast reines Vizin erhalten = 0·23%. Bei Verarbeitung großer Mengen wird das Samenpulver mit verdünnter Salzsäure digeriert, die abgepreßte Lösung mit Kalziumhydroxyd alkalisch gemacht und die filtrierten Lösungen mit Quecksilberchlorid und Kalkmilch versetzt, solange noch ein weißer flockiger Niederschlag entsteht. Die entstandene Fällung wird auf ein Filter gebracht, gut ausgewaschen und unter Zusatz von Bariumhydroxyd bis zur Siedehitze erwärmt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die heiße Lösung abfiltriert und der vorhandene

[1]) *H. Ritthausen:* Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **29**. 894 (1896); Journ. Chem. Soc. **36**. 337 (1914).

[2]) *H. Ritthausen*: Journ. f. prakt. Chem. (2.) **29**. 202 (1881).

Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Beim Eindunsten erfolgt zuerst noch eine flockige Ausscheidung von Proteinsubstanzen, welche entfernt werden. Man dunstet auf ein kleines Volumen ein, worauf nach kurzer Zeit das Vizin nahezu vollständig auskristallisiert; die hievon getrennte Mutterlauge gibt bei weiterem Konzentrieren und Stehenlassen glänzende Blättchen von Konvizin.

Behufs Reinigung wird das Vizin aus 80%igem Weingeist oder aus kochendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert.

Synthetische Versuche auf dem Gebiete der Nukleinsäuren.

Von Privatdozent **Dr. Thannhauser,** München.

1. Synthesen der Bausteine der Nukleinsäuren und ihrer Abkömmlinge (Purin- und Pyrimidinbasen).

a) Synthese von Purinen.

Die vollständige, synthetische Durcharbeitung der Purine verdanken wir *Emil Fischer*. — Die Harnsäure war seit ihrer Entdeckung durch *Scheele* im Jahre 1776 der Gegenstand vieler chemischer Arbeiten. Aber erst 58 Jahre nach ihrer Entdeckung gelang es *J. Liebig*[1]) und gleichzeitig *E. Mitscherlich*[2]), die elementare Zusammensetzung der Harnsäure festzustellen und daraus die Formel $C_5 H_4 N_4 O_3$ abzuleiten. In gemeinschaftlicher Arbeit mit *Wöhler* „Untersuchungen über die Natur der Harnsäure" [3]) konnte *Liebig* die Beziehungen der Harnsäure zu Allantoin, Alloxan, Parabansäure und anderen Ureiden zeigen und so die Grundlagen für einen synthetischen Aufbau der Harnsäure liefern. Der erste synthetische Versuch *Liebigs* und *Wöhlers*, die Harnsäure aus Uramyl und Cyansäure aufzubauen, mißlang. 25 Jahre später nahm *Adolf Baeyer* den synthetischen Gedanken *Liebigs* abermals auf und brachte Uramyl und zyansaures Kali in Reaktion[4]). Das Reaktionsprodukt war die Pseudoharnsäure, eine Substanz, die sich nur mehr um ein Wassermolekül von der wirklichen Harnsäure unterschied. Den Ringschluß der Pseudoharnsäure unter Wasseraustritt zur Harnsäure herbeizuführen, gelang *Emil Fischer* erst 30 Jahre nach der *Baeyers*chen Pseudoharnsäuresynthese im Jahre 1895, indem er die Pseudoharnsäure mit Oxalsäure verschmolz[5]). Eine Synthese der Harnsäure war zwar schon im Jahre 1882 von *Horbazewski*[6]) durch Schmelzen von Glykokoll und Harnstoff und im Jahre 1888 von *Behrend*[7]), welcher Azetessigester und Harnstoff kombinierte,

---

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **10**. 47 (1834).
[2]) *Poggendorfs* Ann. d. Phys. u. Chem. **33**. 335.
[3]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **26**. 241 (1838).
[4]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **127**. 1 und 199; **130**. 129; **131**. 291.
[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**. 2473 (1895); **30**. 559 (1897).
[6]) Monatsh. f. Chem. **1882**. 796; **1885**. 356.
[7]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **251**. 235 (1888).

über das so entstehende Methylurazil zur Isodialursäure gelangte und diese dann mit Harnstoff zur Harnsäure vereinigte, durchgeführt worden, aber keine dieser Synthesen gewährte einen so klaren Einblick in die Struktur der Harnsäure als die *Baeyer-Fischer*sche Synthese. Harnstoff und Malonsäure geben Malonylharnstoff. Mit salpeteriger Säure entsteht daraus die Isonitrosoverbindung (Violursäure), welche durch Reduktion in Uramyl verwandelt wird. Das Uramyl liefert mit Kaliumcyanat die Pseudoharnsäure, die durch Wasserentziehung (mit Oxalsäure oder Salzsäure) in Harnsäure übergeht.

Für die Harnsäure war durch diese Synthese der strukturelle Aufbau klargestellt, jedoch war es noch nicht geglückt, eindeutige strukturchemische Beziehungen der Harnsäure zu ähnlich zusammengesetzten Verbindungen zu finden. Von den Physiologen waren als die in der Natur vorgebildeten Vorstufen der Harnsäure, das Xanthin und Hypoxanthin, und die entsprechenden Aminoverbindungen, das Guanin und Adenin, erkannt worden. *Kossel* und seine Schüler stellten diese Körper analytisch durch saure Hydrolyse der Nukleinsäuren dar, während *Horbazewski* durch fermentative Verdauung und Autolyse der Nukleinsäuren zeigen konnte, daß aus den Nukleinsäuren bei reichlichem Zutritt von Sauerstoff zur Verdauungsflüssigkeit Harnsäure entsteht. Diese physiologische Erkenntnis der Verwandtschaft der Harnsäure zu Guanin, Adenin, Xanthin und Hypoxanthin wurde durch die klassischen Untersuchungen *E. Fischer*s strukturchemisch aufgeklärt.

Fischer leitete diese Gruppe von Substanzen von einem Grundkörper ab, den er Purin (purum uricum) nannte. Das Purin $C_5 H_4 N_4$ ist die der Harnsäure $C_5 H_4 N_4 O_3$ entsprechende Wasserstoffverbindung. Für die Harnsäure hat *E. Fischer* die Formel von *Medicus* übernommen, da nur diese Formel den experimentellen Tatsachen gerecht wird.

```
HN — CO
 |    |
OC    C — NH
 |    ||     >CO
HN —  C — NH
```

An Stelle der „Keto"-Formulierung kann man die Harnsäure auch in der „Enol"-Formulierung anschreiben.

```
        N = C . OH
        |   |
OH — C      C — NH
        |   |       ≥C . OH
        N — C — N
```

Den in dieser Harnsäureformel enthaltenen neungliederigen Kern nennt *E. Fischer* den Purinkern.

```
N1 — C6
|    |
C2   C5 — N7
|    |      >C8
N3 — C4 — N9
```

Die in dem Schema eingesetzte Nummerisierung schlug *E. Fischer* vor, um eine einheitliche Nomenklatur der Puringruppe zu ermöglichen. Die Grundsubstanz der Purine, das Purin $C_5 H_4 N_4$, ist eine Kombination von einem Pyrimidin (Metadiazin) und einem Imidazolring.

```
   N = CH                 N = CH        HC — NH
   |    |                 |    |        ||      >CH
  HC    C — NH           HC    CH       HC — N
   ||   ||    >CH         ||   ||
   N —  C — N             N — CH
```

Die synthetischen und strukturellen Untersuchungen der Puringruppe gingen jedoch nicht von diesen einfachsten Vertretern dieser Körperklasse aus, sondern führten von den substituierten, in der Natur vorgebildeten Purinen durch Abbau und Substitution erst zum Grundkörper.

Bei der synthetischen Durcharbeitung der Puringruppe benützte *Emil Fischer* in der Hauptsache 5 Methoden: 1. Synthese der Harnsäure und ihrer Methylderivate aus der einfachen und methylierten Pseudoharnsäure; 2. die direkte Methylierung der Harnsäure und der Xanthine; 3. die Verwandlung der Harnsäure und der Dioxypurine in Chloride durch Einwirkung von Chlorphosphor; 4. die Überführung der Chlorverbindungen in Oxy-, Thio- und Aminoderivate; 5. die Reduktion der Chlorpurine durch Jodwasserstoff oder Zinkstaub zu den entsprechenden Wasserstoffverbindungen. Mit Hilfe dieser Methoden ist es *Emil Fischer* gelungen, die in den Nukleinsäuren vorgebildeten Aminopurine, Adenin und Guanin, die aus den Aminopurinen entstandenen Oxypurine, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure, die methylierten Xanthine, Theobromin, Theophyllin und Koffein sowie die methylierten Harnsäuren auf synthetischem Wege herzustellen.

Im Anschluß an die Untersuchungen *Emil Fischers* wurde die Puringruppe von den verschiedensten Gesichtspunkten aus synthetisch durchgearbeitet. In den technischen Großbetrieben und zur präparativen Herstellung der einfachen und substituierten Purine wird gegenwärtig die Methode, welche *W. Traube* zur Syn-

these von Purinen ausarbeitete, am häufigsten angewandt. ***Traube*** kondensierte Cyanessigsäure und Cyanessigsäureester mit einfachen oder substituierten Harnstoffen zu 4-Aminopyrimidinen. Die 4-Aminopyrimidine lassen sich durch Nitrosierung und Reduktion in 4.5-Diaminopyrimidine verwandeln. Die 4.5-Diaminopyrimidine werden durch Kochen mit Ameisensäure in die Formylverbindung übergeführt, welche hinwiederum durch starkes Erhitzen unter Schließung des Imidazolringes in die gesuchten Purinkörper übergehen.

Bei der folgenden Beschreibung der verschiedenen Purinsynthesen stelle ich die Synthese der Harnsäure an die Spitze, da die Harnsäure der erste Körper dieser Gruppe war, welcher synthetisch hergestellt wurde und da die Harnsäure für die meisten Purinsynthesen nach ***E. Fischer*** als Ausgangsmaterial benötigt wird.

Synthese der Harnsäure (2.6.8-Trioxypurin).

***Baeyer-Fischer*sche Harnsäuresynthese.**

$$\begin{array}{cccccccccccc}
NH_2 & & HO\,OC & & NH & - & CO & & NH & - & CO & \\
| & & | & & | & & | & & | & & | & \\
CO & + & CH_2 & \longrightarrow & CO & & CH_2 & \longrightarrow & CO & & C{=}NOH & \longrightarrow \\
| & & | & & | & & | & & | & & | & \\
NH_2 & & HO\,OC & & NH & - & CO & & NH & - & CO &
\end{array}$$

Harnstoff Malonsäure — Barbitursäure — (Isonitrosobarbitursäure) Violursäure

$$\begin{array}{cccccccccccc}
 & NH & - & CO & & NH & - & CO & & NH & - & CO & \\
 & | & & | & & | & & | & & | & & | & \\
\longrightarrow & CO & & C.NH_2 & \longrightarrow & CO & & C.NH.CO.NH_2 & \longrightarrow & CO & & C-NH & \\
 & | & & | & & | & & | & & | & & \| & >CO \\
 & NH & - & CO & & NH & - & CO & & NH & - & C\;\;NH &
\end{array}$$

(Aminobarbitursäure) Uramil — Pseudoharnsäure — Harnsäure.

Darstellung der Barbitursäure[1]. Ein inniges Gemenge von gleichen Teilen Malonsäure, Harnstoff und Phosphoroxychlorid wird 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, die Masse in kochendem Wasser aufgenommen und bis auf 20° erkalten gelassen, wobei sich ein Teil der Substanz sofort in Flocken ausscheidet. Nach 24 Stunden wird der unreine ausgeschiedene Malonylharnstoff in 50 Teilen kochenden Alkohols gelöst, auskristallisiert und nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert.

Umwandlung der Barbitursäure in Violursäure: Barbitursäure wird mit dem doppelten Gewicht Wasser und etwas mehr als der berechneten Menge Kalium oder Natrium-

[1] *Grimaux*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **12.** 378; Compt. rend. Nr. 2, 85.

nitrit geschüttelt, wobei von selbst Erwärmung eintritt. Zum Schluß erwärmt man kurze Zeit auf dem Wasserbade, um die Reaktion zu Ende zu führen. Während der Operation scheidet sich bereits die Violursäure als dicker Kristallbrei ab. Nach dem Erkalten wird das Salz mit wenig Eiswasser gewaschen und aus möglichst wenig warmem Wasser umkristallisiert. Für die Darstellung der freien Violursäure zerlegt man das in Wasser suspendierte Alkalisalz mit Schwefelsäure. Aus der warmen filtrierten Flüssigkeit scheidet sich dann beim Erkalten Violursäure ab.

Reduktion der Violursäure zu Uramil: 10 Teile einer Jodwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·96) wird mit einem Fünftel Gewichtsteil Wasser verdünnt und auf — 20° abgekühlt. In die abgekühlte Jodwasserstoffsäure trägt man allmählich unter Umschütteln einen Teil gepulverte Violursäure ein, wobei alsbald Jod in Freiheit gesetzt wird und eine dunkle Masse entsteht. Man fügt dann zerriebenes Jodphosphonium hinzu, setzt das Schütteln fort und läßt die Flüssigkeit sich allmählich auf Zimmertemperatur erwärmen. Nach 1 bis 2 Stunden, wenn die Farbe der Flüssigkeit hellbraun geworden ist, ist die Reaktion beendet und das jodwasserstoffsaure Uramyl in kleinen bräunlichen Kristallen abgeschieden. Es wird auf Glaswolle abgesaugt und mit Jodwasserstoffsäure der gleichen Konzentration gewaschen. Um das freie Uramyl zu gewinnen, übergießt man das gepulverte Salz mit Eiswasser und fügt etwas mehr als die berechnete Menge Natriumazetat hinzu. Für die weitere Verarbeitung auf Pseudoharnsäure ist das Produkt rein genug. Es ist ein schwach braun gefärbtes Kristallpulver.

Darstellung der Pseudoharnsäure: Man kocht Uramyl mit einer konzentrierten Lösung von cyansaurem Kali, bis nach Luftzutritt keine rote Farbe mehr entsteht. Sollte dies nach einiger Zeit noch geschehen, so muß man noch etwas zyansaures Kali hinzufügen. Das pseudoharnsaure Kali scheidet sich dabei als gelbliches Kristallpulver aus. Die freie Pseudoharnsäure erhält man durch Auflösen des aus Wasser umkristallisierten Kalisalzes in Kalilauge und Fällen mit Salzsäure. Die feingepulverte Pseudoharnsäure wird in der 500fachen Menge 20%iger Salzsäure durch 15 bis 20 Minuten langes Kochen gelöst. Die Lösung wird über freiem Feuer bis auf etwa ein Fünfzehntel ihres Volumens eingedampft, wobei sich die gebildete Harnsäure schon in der Wärme zum größten Teil kristallinisch abscheidet. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit Wasser verdünnt und filtriert. Das Produkt ist farblos. Die Ausbeute bedingt 80% der angewendeten Pseudoverbindung. Zur Reinigung löst man in warmer verdünnter Lauge und fällt mit Salzsäure. Die so gewonnene Harnsäure kristallisiert sofort in mikroskopischen rechtwinkeligen Täfelchen.

Harnsäuresynthese nach *Behrend* und *Roosen*[1]).

```
NH2     COOC2H5        NH2   COOC2H5        NH2   COONa
|       |              |     |              |     |
CO  +   CH2      -->   CO    CH       -->   CO    CH      -->
|       |              |     ||             |     ||
NH2     CO.CH3         NH — C.CH3           NH — C.CH3
Harnstoff Acetessigester β-Uramidokrotonsäureester β-Uramidokrotonsäure

     NH — CO          NH . CO                NH — CO
     |    |           |    |                 |    |
-->  CO   CH    -->   CO   C(NO2)      -->   CO   C.NO2   -->
     |    |           |    ||                |    ||
     NH — C.CH3       NH — C.COOH            NH — CH
  4-Methylurazil  5-Nitrourazil-4-karbonsäure  5-Nitrourazil

     NH — CO           NH — CO           NH — CO
     |    |            |    |            |    |
-->  CO   C.NH2  -->   CO   C.OH   -->   CO   COH      -->
     |    ||           |    ||           |    ||
     NH — CH           NH — CH           NH — C.OH
                     5-Oxyurazil        Isodialursäure
  5-Aminourazil    (Isobarbitursäure)   4.5-Dioxyurazil.

      NH — CO                                NH — CO
      |    |                                 |    |
-->   CO   C.|OH   H| NH                -->  CO   C — NH
      |    ||    +      >CO                  |    ||     >CO
      NH — C.|OH   H| NH                     NH — C — NH
  4.5-Dioxyurazil + Harnstoff              2.6.8-Trioxypurin.
```

80 *g* Acetessigester und 40 *g* feingepulverter Harnstoff werden innig vermischt und 50 bis 60 cm^3 absoluter Alkohol und 10 Tropfen konzentrierte Salzsäure zugegeben. Die Masse bringt man in eine flache Schale und läßt über Schwefelsäure im Vakuum vollständig trocknen. Den so entstandenen β-Uramidokrotonsäureester trägt man in eine heiße Lösung von 40 *g* Kalihydrat in 600 cm^3 Wasser ein und säuert, nachdem alles in Lösung gegangen ist, mit Salzsäure an. Beim Erkalten kristallisiert Methylurazil in einer Menge von 48 bis 56 *g* aus und ist nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser für weitere Verarbeitung hinreichend rein. Methylurazil wird durch rote rauchende Salpetersäure in Nitrourazilkarbonsäure verwandelt. Man bringt in ein großes Becherglas 90 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure, 180 cm^3 käufliche Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·4), die zuvor mit salpeteriger Säure gesättigt ist. Dann gibt man auf

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **229**. 1 (1885); **251**. 253 (1888).

einmal 48 *g* Methylurazil hinzu. Alsbald tritt eine äußerst heftige Reaktion ein, nach deren Beendigung man erkalten läßt. Die durch ausgeschiedene Nitrourazilkarbonsäure teilweise erstarrte Masse löst man in 900 *cm*³ Wasser und fügt unter Umrühren 60 *g* festes Kalihydrat hinzu. Innerhalb 24 Stunden kristallisieren 48 bis 66 *g* nitrourazilkarbonsaures Kali (49 bis 68% der Theorie) aus. Die Nitrourazilkarbonsäure spaltet beim Kochen mit Wasser ihr Kalisalz beim Erhitzen auf 130° 1 Molekül Kohlensäure ab, unter Bildung von Nitrourazil bezw. Kaliumnitrourazil.

40 *g* Kaliumnitrourazil werden unter gutem Umrühren in eine Mischung von 500 *cm*³ 25%iger Salzsäure und 250 *cm*³ Wasser eingetragen und unter Kühlung durch Wasser 60 *g* Zinn hinzugebracht. Binnen 2 Tagen scheidet sich die Isobarbitursäure vollständig aus und wird durch Lösen in verdünnter heißer Kalilauge und Fällen mit Salzsäure gereinigt. Das Filtrat von der Isobarbitursäure enthält das Chlorhydrat des Amidourazils. Ausbeute an Isobarbitursäure 30 bis 45%. Durch Oxydation mit Bromwasser entsteht aus der Isobarbitursäure eine um ein Sauerstoff reichere, der Dialursäure isomere Verbindung. 8 *g* fein gepulverter Isobarbitursäure werden mit 60 *cm*³ Wasser übergossen und unter lebhaftem Umrühren 9 *g* Brom hinzugefügt. Die Lösung erwärmt sich auf etwa 30°, das Brom verschwindet, während die Isobarbitursäure größtenteils in Lösung geht. Man setzt noch so viel Brom hinzu, bis bleibende Rotfärbung eintritt. Man braucht dann im ganzen 1 Molekül Brom auf 1 Molekül Isobarbitursäure. Die noch warme Lösung wird von der etwa ungelöst gebliebenen geringen Menge Isobarbitursäure abfiltriert und scheidet binnen kurzem etwa 2 Drittel des entstandenen Oxydationsproduktes ab, während 1 Drittel beim Verdunsten über Schwefelsäure in zentimeterlangen Prismen auskristallisiert. Aus 8 *g* Isobarbitursäure 9.6 *g* der Isodialursäure. Die Isodialursäure kristallisiert mit 2 Molekülen Wasser, von denen eines bei 100°, das zweite bei 140° entweicht. Durch Kondensation mit einem Molekül Harnstoff wird die Isodialursäure leicht in Harnsäure übergeführt. Um 1 Molekül Kristallwasser zu entfernen, wird die Isodialursäure bei 100° getrocknet und dann mit der gleichen Gewichtsmenge Harnstoff und der sechsfachen Menge konzentrierter Schwefelsäure etwa 5 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt. Längeres Erhitzen vermindert die Ausbeute. Nach dem Erkalten wird mit Wasser verdünnt und die gefällte Harnsäure abfiltriert. Behufs weiterer Reinigung kocht man ein- bis zweimal mit nicht allen großen Mengen Wasser aus. In Lösung geht etwas Harnsäure mit dem roten Farbstoff, während die zurückbleibende Hauptmenge der Harnsäure fast rein weiß ist. Diese wird in verdünnter Kalilauge gelöst und durch Einleiten von Kohlensäure in die noch stark fluoreszierende Lösung (infolge von Ver-

unreinigungen) das saure Kalisalz der Harnsäure gefällt. Dieses wird wiederum in verdünnter Kalilauge gelöst und in heiße, verdünnte Salzsäure gegossen. Die Harnsäure fällt jetzt als blendend weißes Kristallpulver aus. (Ausbeute 20 bis 32% der Theorie.)

Darstellung der Harnsäure nach *Horbacewski*[1]).

Die Herstellung von Harnsäure nach *Horbacewski* durch Zusammenschmelzen von Glykokoll und Harnstoff (1 Teil Glykokoll 7 bis 15 Teile Harnstoff) ergibt schlechte Ausbeuten. Auf 1 *g* Glykokoll 50 bis 150 *mg* Harnsäure. Aus der Schmelzmasse wird die Harnsäure nach dem Auflösen in Lauge durch ammoniakalische Silberlösung und Magnesiamixtur gefällt. Der Silberniederschlag wird mit Schwefelkaliumlösung in der Wärme zersetzt, vom Schwefelsilber abfiltriert und das Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Beim Eindampfen dieser Lösung krystallisiert die Harnsäure aus. Um die Harnsäure farblos zu erhalten, muß die Silberfällung und -Zersetzung öfters wiederholt werden. Die Methode hat nur historisches und theoretisches Interesse.

Synthese der Harnsäure nach *Traube*[2]).

```
NH2    CO OH         NH — CO           N = C . OH
|      |             |    |            |   |
CO  +  CH2     -->   CO   CH2   -->  OH C   CH         -->
|      |                  |            ||  ||
NH2    CN            NH2  CN           N — C — NH2
Harn-  Cyanessig-    Cyanazetyl-     4-Aminodioxypyrimidin
stoff  säure         harnstoff

              HN — CO                       H = C OH
              |    |                        |   |
-->   OH . C       C = N OH   -->   OH . C      C . NH2   -->
           ||      |                     ||     ||
           N — C = NH                    N — C . NH2
4-Amino-5-Isonitroso-2.6-Dioxypyrimidin  4.5-Diamino-2.6-dioxypyrimidin

           N = C OH                              HN — CO
           |   |                                 |    |
-->  OH . C    C . NH . C OO . C2 H5   -->   O C     C — NH
          ||   ||                               |    ||     >CO
          N — C — NH2                           HN — C — NH
Urethan des 4.5-diaminodioxypyrimidins              Harnsäure.
```

Darstellung des Cyanacetylharnstoffes: Man läßt Phosphoroxychlorid (1 Molekül) allmählich zu einem Gemisch von Harnstoff (6 Moleküle) und Cyanessigsäure (2 Moleküle)

---

[1]) Monatsh. d. Chem. **6**. 356 (1885); **8**. 854 (1887).

[2]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3035 (1900).

zutropfen. Die Masse verflüssigt sich bald durch die bei der Reaktion frei werdende Wärme und wird erst später wieder fest. Es kommt darauf an, daß das Phosphoroxychlorid s e h r langsam zugegeben und das Gemenge der anderen Substanzen in steter Bewegung gehalten wird. Allzu starke Erhitzung des Reaktionsgemisches, welches sich auch durch Dunkelfärbung desselben kundgibt, ist zu vermeiden. Nach Beendigung der Reaktion wird die Masse mit kaltem Wasser behandelt, das den gebildeten Cyanacetylharnstoff ungelöst läßt, während die anderen Stoffe alle in Lösung gehen. Man erhält eine etwas größere Gewichtsmenge Cyanacetylharnstoff als man Zyanessigsäure angewandt hat.

Überführung des Cyanacetylharnstoffes in das isomere 4-Amino-2.6-dioxypyrimidin: Man trägt etwa 5 *g* des Harnstoffes in 10 *cm*³ 40%iger Lauge ein, wobei gleich Festwerden unter Bildung des Natriumsalzes, dann Verflüssigung und kurz darauf erneutes Festwerden, nunmehr unter Ausscheidung des Natriumsalzes der zyklischen Verbindung, eintritt. Durch Versetzen der alkalischen Masse mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion erhält man das freie Aminodioxypyrimidin in farblosen Kristallen. 4 *g* aus 5 *g* Cyanacetylharnstoff.

Darstellung der Isonitrosoverbindung: Das Aminodioxypyrimidin wird in heißes Wasser, in welchem etwas mehr als die berechnete Menge Natriumnitrit gelöst ist, eingetragen und zu der sodann zum Sieden erhitzten Flüssigkeite in nicht zu großer Überschuß von Essigsäure gefügt wird. Der Isonitrosokörper wird hiebei als dunkel rosa, aus mikroskopischen Nädelchen bestehendes Kristallpulver erhalten. Ausbeute 80% der Theorie.

Reduktion des Isonitrosokörpers: Zur Reduktion des Isonitrosokörpers trägt man denselben fein gepulvert in die etwa 15 bis 20fache Menge heißen Wassers ein und fügt allmählich die dreifache Menge (auf angewandte Isonitrosoverbindung berechnet) käuflicher Ammoniumsulfidlösung hinzu. Man erhitzt dann vorsichtig weiter, bis zur beginnenden Reaktion, die unter lebhaftem Aufwallen und Abscheidung von viel Schwefel eintritt, bevor der Siedepunkt der Flüssigkeit erreicht ist. Schließlich erhitzt man zum Sieden und kocht bis zur Verjagung des Schwefelwasserstoffes, doch muß man sich überzeugen, ob der Schwefelniederschlag rein gelb ist oder noch Teilchen des roten Isonitrosokörpers beigemengt enthält. Ist dies der Fall, so muß noch etwas Schwefelammonium zugesetzt werden. Ist die Reduktion beendet, so saugt man vom Schwefel ab und läßt das Filtrat erkalten. Es scheidet sich dann aus demselben, falls es nicht zu verdünnt ist, ein Teil der Diaminoverbindung als schweres, gelblich gefärbtes Kristallpulver ab. Aus dem Filtrat von diesem gewinnt man den Rest durch Zusatz verdünnter Schwefelsäure als Sulfat.

Darstellung der Harnsäure aus dem 4.5-Diamino-2.6-dioxypyrimidin: Man löst das Sulfat des 4.5-Diamino-2.6.dioxypyrimidins in 4 M.-G. verdünnter Natronlauge und fügt 2 M.-G. Chlorkohlensäureester hinzu. Es verschwindet der Chlorkohlensäureester allmählich, während die Flüssigkeit sich erwärmt und ein kristallinischer Niederschlag sich ausscheidet. Zur völligen Abscheidung desselben versetzt man nach Ablauf der Reaktion die Flüssigkeit mit Essigsäure und läßt sie einige Stunden in der Kälte stehen. Diese Verbindung wird aus nicht zu viel heißem Wasser umkristallisiert. Durch wiederholtes Lösen in Alkali und Fällen mit Essigsäure erhält man sie rein. Dieser Körper ist das Urethan des Diaminodioxypyrimidins. Löst man dieses Urethan in genau 1 M.-G. nicht zu verdünnter Natronlauge und fügt zur Lösung Alkohol, so erhält man das Natriumsalz als kristallinischen Niederschlag. Um dasselbe in harnsaures Natrium überzuführen, erhitzt man es in einem offenen Gefäße im Trockenkasten zunächst auf etwa 150° und später auf 180 bis 190°. Das nach Verlauf einiger Stunden entstandene, nur schwach gefärbte harnsaure Natrium wird in heißem Wasser unter Zusatz von Natronlauge gelöst und die Lösung mit Salzsäure versetzt. Diese Umfällung wird, nachdem vorher die unreine Harnsäure wiederholt mit Wasser ausgekocht wurde, mehrmals wiederholt, die Harnsäure kristallisiert dann in der bekannten Kristallform. Ausbeute 40 bis 50% des Urethans.

Synthese des Adenins[1]).

```
HN — CO                              N = C . Cl
 |    |                              |    |
OC    C — NH       ——>            Cl C    C — NH       ——>
 |    ||    >CO                      ||   ||    >CO
HN — C — NH                          N — C — NH
  Harnsäure                      8-Oxy-2.6-chlorpurin

        N = C . Cl                     N = C . NH2
        |    |                         |    |
——>  Cl C    C — NH        ——>    Cl . C    C . NH        ——>
        ||   ||    >C . Cl             ||   ||    >C . Cl
        N — C — N                      N — C — N
       Trichlorpurin            6-Amino-2.8-dichlorpurin

                     N = C . NH2
                     |    |
             ——>    HC    C — NH
                     ||   |    >CH
                     N — C — N
                       Adenin.
```

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2208, 2220, 2226 (1897).

1 Teil scharf getrocknetes harnsaures Kalium wird mit 1 bis 2 Teilen Phosphoroxychlorid gut gemischt und im geschlossenen Gefäß 6 Stunden auf 160 bis 170° erhitzt. Im kleinen gibt man zweckmäßig harnsaures Kalium und Oxychlorid schichtweise ins Einschmelzrohr und schüttelt nach dem Zuschmelzen kräftig durcheinander. Nach dem Erkalten ist noch ziemlich starker Druck im Gefäß. Man zersetzt die dunkel gefärbte, zusammengebackene Masse mit Wasser und saugt das abgeschiedene Produkt ab. Zur Zerstörung der Nebenprodukte trägt man die auf dem Wasserbade getrocknete Masse in 4 bis 6 Teile heiße Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·4 portionsweise ein und kocht 20 bis 30 Minuten über freier Flamme. Dabei bleibt das Oxydichlorpurin zum größten Teil ungelöst. Der Rest scheidet sich beim Verdünnen mit Wasser ab. Man erhält so ein gelb gefärbtes, fein kristallinisches Pulver. Die Ausbeute beträgt 40 bis 50% des angewandten harnsauren Kaliums.

Für die weitere Reinigung dient das schön kristallisierende Ammoniumsalz, welches am besten in alkoholischer Lösung bereitet wird. Man suspendiert zu dem Zwecke das gepulverte Oxydichlorpurin etwa in der 24fachen Gewichtsmenge siedenden Alkohols und fügt dann alkoholisches Ammoniak hinzu, bis das Purin unter Zurücklassung von einigen braunen Flocken in Lösung gegangen ist. Man kocht dann noch etwas mit Tierkohle und filtriert. Beim Erkalten scheidet sich das Ammoniumsalz in großen, ganz schwach gelb gefärbten Blättern ab. Wird die Kristallisation durch starke Abkühlung befördert, so beträgt die Ausbeute etwa zwei Drittel des angewandten Oxydichlorpurins. Der Rest desselben wird aus der Mutterlauge durch Eindampfen und abermalige Kristallisation gewonnen. Aus dem Ammoniumsalz gewinnt man durch Lösen in Wasser und Ansäuern das Oxydichlorpurin. Die Ausbeute beträgt etwa 80% des Rohproduktes oder 32 bis 40% des angewandten harnsauren Kaliums. Oxydichlorpurin wird beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 350° schwach braun und zersetzt sich bei höherer Temperatur, ohne zu schmelzen.

Überführung des 8-Oxy-2:6-dichlorpurins in das Trichlorpurin: Eine bestimmte Menge 8-Oxy-2.6-dichlorpurin wird mit der 70fachen Menge Phosphoroxychlorid im geschlossenen Gefäß 4 Stunden im Ölbade auf 150 bis 155° unter möglichst häufiger Bewegung der Masse erhitzt. Zum Schluß der Operation muß eine klare, nur schwach gelb gefärbte Lösung entstanden sein. Verdampft man dieselbe jetzt im Vakuum, bis das Phosphorchlorid möglichst vollständig entfernt ist, so bleibt ein amorpher Rückstand, welcher beim Schütteln mit kaltem Wasser kristallinisch wird. Das farblose Produkt wird filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Seine

9*

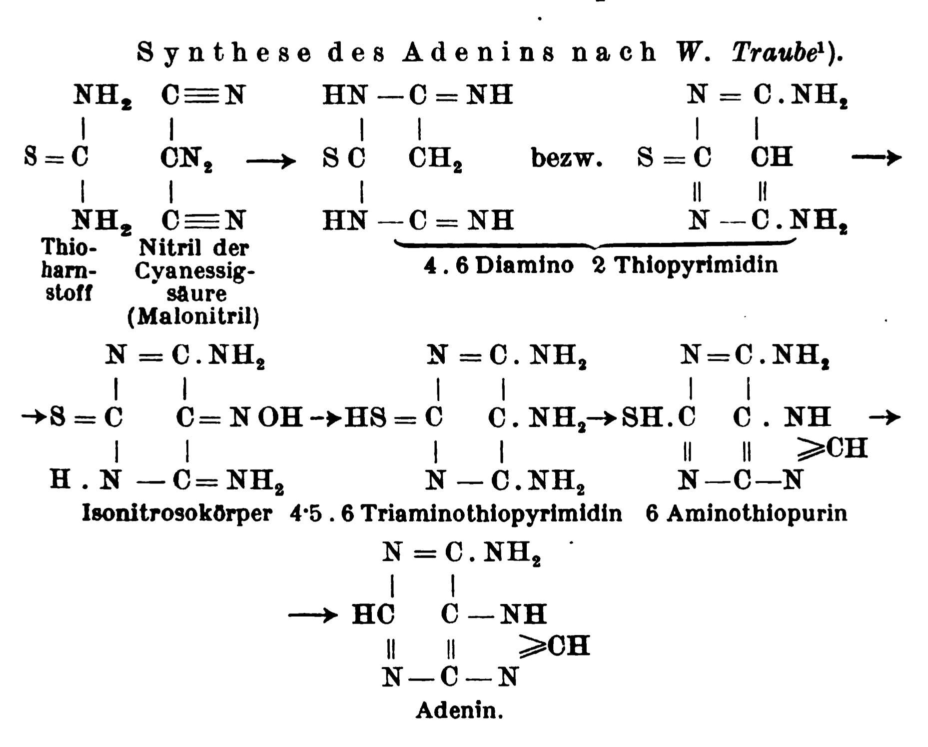
Menge beträgt fast ebensoviel wie diejenige des angewandten Oxydichlorpurins. Dasselbe wird zunächst mit der fünffachen Gewichtsmenge Äther ausgelaugt, wobei der allergrößte Teil in Lösung geht. Nach dem Verdampfen des Äthers wird der kristallisierende Rückstand mit der 60fachen Menge Wasser ausgekocht, wobei das Trichlorpurin anfangs schmilzt und sich völlig löst, während ein ihm beigemengter Fremdkörper als feste Masse zurückbleibt. Aus der heiß filtrierten Flüssigkeit fällt beim Erkalten das Trichlorpurin in feinen farblosen Blättchen aus, welche nahezu rein sind. Ihre Menge betrug nach dem Trocknen bei 110° ungefähr 65% des angewandten Oxydichlorpurins. Zur völligen Reinigung löst man das Produkt in der vierfachen Menge warmen Wassers unter Zusatz von Ammoniak. Beim Erkalten scheidet sich das Ammoniaksalz in langen Nadeln aus, welche größtenteils zu kugelförmigen Aggregaten vereinigt sind. Dieselben werden nach dem Abkühlen auf 0° filtriert und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Man löst es wieder in warmem Wasser, kühlt ab und übersättigt, bevor die Kristallisation beginnt, mit Salzsäure. Es kristallisiert dann das reine Trichlorpurin in schönen großen Blättern. Verlust bei der Reinigung 5%. Die lufttrockenen Kristalle enthalten 5 Moleküle Wasser, welches bei mehrstündigem Erhitzen auf 110° entweicht. Zersetzungsprodukt 184 bis 186°.

6-Amino-2.8-dichlorpurin (Dichloradenin): Das reine getrocknete Trichlorpurin wird mit der zehnfachen Menge wässerigen Ammoniaks, welches bei Zimmertemperatur gesättigt ist, im geschlossenen Gefäß 6 Stunden auf 100° erhitzt. Zunächst geht die Verbindung als Ammoniaksalz in Lösung und wird dann fast quantitativ in die Aminoverbindung verwandelt. Läßt man die Lösung erkalten und längere Zeit stehen, so scheidet sich das Ammoniumsalz der letzteren teilweise in schönen, farblosen Prismen ab. Zur Isolierung des Aminodichlorpurins ist es aber zweckmäßiger, die ammoniakalische Lösung direkt auf dem Wasserbade zur Trockne zu verdampfen. Dabei wird das Ammoniaksalz zerlegt und das Aminodichlorpurin fällt schon während der Operation kristallinisch aus. Der trockene Rückstand wird mit warmem Wasser behandelt, um das Chlorammonium zu entfernen, und die schwer lösliche Aminoverbindung abfiltriert. Die Ausbeute beträgt 95% der Theorie. Zur Reinigung wird die Substanz aus 200 Teilen Alkohol umkristallisiert. Die Substanz hat keinen Schmelzpunkt, färbt sich über 300° allmählich braun.

Verwandlung des 6-Amino-2.8-dichlorpurin in Adenin. Trägt man das gepulverte Aminodichlorpurin in die zehnfache Menge Jodwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·96) ein, so erwärmt sich die Masse gelinde, es geht ein erheblicher Teil der Aminoverbindung in Lösung und die alsbald eintretende Reaktion

gibt sich durch starke Bräunung der Flüssigkeit kund. Man fügt gepulvertes Jodphosphonium im Überschuß zu und schüttelt das Gemisch 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Dann ist die Reduktion zum allergrößten Teil beendet und das jodwasserstoffsaure Adenin zumeist als schwach gefärbte Kristallmasse ausgeschieden. Man erhitzt zum Kochen, bis eine klare und fast farblose Lösung entsteht; sollte dabei noch Jodabscheidung stattfinden, so fehlt es an Jodphosphonium. Beim Erkalten der Lösung scheiden sich große farblose Prismen ab, welche auf Glaswolle filtriert und mit wenig starker Jodwasserstoffsäure gewaschen werden. Beim Verdampfen der jodwasserstoffsauren Mutterlauge erhält man noch eine zweite Kristallisation des Adeninjodhydrates, so daß die Gesamtausbeute fast theoretisch ist. Aus der warmen, konzentrierten, wässerigen Lösung des Salzes wird durch Ammoniak die Base sofort als farblose kristallinische Masse gefällt. Den Rest gewinnt man durch Verdampfen der Mutterlauge und Auslaugen des Rückstandes mit kaltem Wasser. Adenin hat keinen Schmelzpunkt.

Synthese des Adenins nach *W. Traube*[1]).



Zu einer Lösung von 1·8 *g* Natrium in wenig absolutem Alkohol werden 6 *g* trockener, fein gepulverter Schwefelharnstoff und 5 *g* Malonitril gefügt und das Gemisch 2 Stunden lang am Rückfluß-

[1]) *W. Traube*, Annalen, 331. 64. (1904).

kühler gekocht. Binnen kurzem trübt sich die zuerst klare Lösung unter Abscheidung von farblosen Kristallen, die sich auf dem Boden des Gefäßes absetzen. Man trennt nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit die Flüssigkeit von dem Niederschlage, dampft rasch ein und nimmt den Abdampfrückstand mit Wasser auf. In dieser Lösung fügt man sodann den Niederschlag, der sich ebenfalls in Wasser leicht löst, und säuert die Flüssigkeit mit Essigsäure gerade an. Das Diaminothiopyrimidin scheidet sich hierauf in farblosen, feinen Nädelchen aus. Aus 5 *g* Malonitril 6 bis 9 *g* Kondensationsprodukt. Nach Umkristallisieren aus Wasser Schmelzpunkt 280°.

Darstellung des Isonitrosokörpers: 6 *g* Diaminothiopyrimidin werden mit 600 cm^3 Wasser übergossen, dann gerade so viel Natronlauge zugefügt, daß unter Bildung des Natriumsalzes Auflösung erfolgt und schließlich 50 cm^3 Eisessig zugegeben. Das durch die Säure in Freiheit gesetzte Diaminothiopyrimidin bleibt bei Gegenwart der vielen freien Essigsäure gelöst. Trägt man nunmehr zu der mit Eis gekühlten Flüssigkeit eine Lösung von 5 *g* Natriumnitrit, so scheidet sich im Verlaufe weniger Stunden die Isonitrosoverbindung als schwerer, tiefgrüner Niederschlag ab. Die darüber stehende Flüssigkeit nimmt dabei rötliche Farbe an. Ausbeute 80 bis 85%. Man saugt den Isonitrosokörper ab, wäscht gut mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther aus und trocknet ihn auf dem Wasserbade, worauf er zur Weiterverarbeitung fertig ist.

Darstellung des 4.5.6-Triamino-2-Thiopyrimidins: Zur Reduktion übergießt man den Isonitrosokörper mit einem starken Überschusse 5- bis 10%iger Schwefelammoniumlösung, in der er sich beim Umschütteln unter Temperaturerhöhung bald auflöst. Bereits nach kurzer Zeit scheidet sich aus der braunen Flüssigkeit das Reduktionsprodukt, das 4.5.6-Triamino-2-thiopyrimidin in gut ausgebildeten glänzenden Kristallen aus, welche gelb gefärbt sind. Man filtriert sie von der schwefelammoniumhaltigen Mutterlauge ab und kristallisiert sie zur Reinigung aus heißem Wasser um. Die Verarbeitung der Mutterlauge lohnt nicht. Aus 10 *g* Isonitrosokörper erhält man 6 *g* Triaminothiopyrimidin.

Thioadenin: 5 *g* Base werden 2 Stunden mit 25 bis 30 cm^3 Ameisensäure (spezifisches Gewicht 1·12) am Rückflußkühler gekocht und dann die überschüssige Säure durch Erhitzen auf dem Wasserbade verjagt. Der schwach gefärbte Rückstand wird aus heißem Wasser umkristallisiert. Zur Darstellung des Kaliumsalzes des Formylkörpers löst man ihn in 8- bis 10%iger Kalilauge (auf 1 Molekül Formylkörper 1 Molekül Kaliumhydroxyd) und fügt dann vorsichtig Alkohol zu, bis das Kaliumsalz völlig ausgefällt ist. Einige Gramm des Kaliumsalzes werden fein gepulvert, im

Luftbade erhitzt, indem man die Temperatur nach und nach bis auf 230° steigert. Das Salz sintert dabei zusammen und man tut gut, es, sobald dies eingetreten, vor dem Fortsetzen des Erhitzens von neuem zu pulvern. War das Salz während etwa 40 Minuten der Temperatur von 230° ausgesetzt, so ist die Abspaltung sowohl des Kristallwassers wie des bei der Ringschließung frei werdenden Wassers und damit die Umwandlung in das Kaliumsalz des Thioadenins beendet. Zur Gewinnung des Thioadenins erhitzt man die wässerige Lösung des Rückstandes zum Sieden und fügt verdünnte Schwefelsäure hinzu, bis der anfangs durch die Säure hervorgerufene Niederschlag sich bis auf wenige Flocken wieder gelöst hat. Darauf versetzt man mit Tierkohle, filtriert, macht das Filtrat alkalisch und übersättigt die noch heiße Flüssigkeit mit Essigsäure. Das Thioadenin scheidet sich je nach der Verdünnung der Lösung entweder bald oder erst nach Verlauf einiger Stunden in schwach gelblichen, kristallinischen Krusten ab, die sich fest an die Gefäßwand anlegen. Ausbeute 2·5 *g* aus 5 *g* Kaliumsalz des Formyltriaminothiopyrimidins. Zur Reinigung wird das Thioadenin in heißem Ammoniak gelöst und durch Essigsäure wieder abgeschieden und diese Operation wiederholt, bis das Präparat nahezu farblos ist.

Adenin: 2 *g* Thioadenin werden auf einem Uhrglas mit 10 cm^3 20%iger Schwefelsäure übergossen, dazu 20 cm^3 3%iges Wasserstoffsuperoxyd gegeben und das Gemisch unter zeitweiligem Umrühren auf dem Wasserbade erhitzt, wobei Auflösung erfolgt. Man dampft nunmehr, ebenfalls auf dem Wasserbade, völlig ein, fügt zum Rückstande nochmals 15 cm^3 Wasserstoffsuperoxyd, verdampft wieder und wiederholt erforderlichenfalls das Eindampfen mit einigen Kubikzentimetern des Oxydationsmittels nochmals. Man erkennt das Ende der Reaktion daran, daß beim Aufnehmen des Abdampfrückstandes mit Wasser eine klare oder doch nur sehr wenig getrübte Lösung erhalten wird. Dies tritt erst nach dem Verschwinden des schwer löslichen Schwefelkörpers ein. Um aus der stark schwefelsauren Lösung das Adenin zu gewinnen, kocht man sie mit Tierkohle auf, filtriert und versetzt nach dem Erkalten das Filtrat mit Ammoniak bis zur neutralen Reaktion. Das Adenin kristallisiert dann in seidenglänzenden Nadeln aus. Man erhält mehr als die Hälfte vom Gewicht des angewandten Thioadenins.

Synthese des Guanins[1]).

```
HN — CO                 N = N . Cl               N = C . Cl
|    |                  |   |                    |   |
OC   C — NH      →    Cl C   C — NH      →    Cl . C   C — NH
|    ||    >CO          ||  |     >CO            ||  ||    >C . Cl
HN — C — NH             N — C — NH               N — C —  N
  Harnsäure           8-Oxy-2.6-dichlorpurin      Trichlorpurin.
```

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2226 (1897).

```
 HN — CO                 HN — CO                  HN — CO
 |    |                  |    |                   |    |
Cl C  C — NH  ——>NH₂.C   C — NH  ——> NH₂C   C — NH
 ||   ||   >C Cl          ||   ||   >C.Cl          ||   ||   >CH
 N  — C — N               N — C — N                N — C — N
```

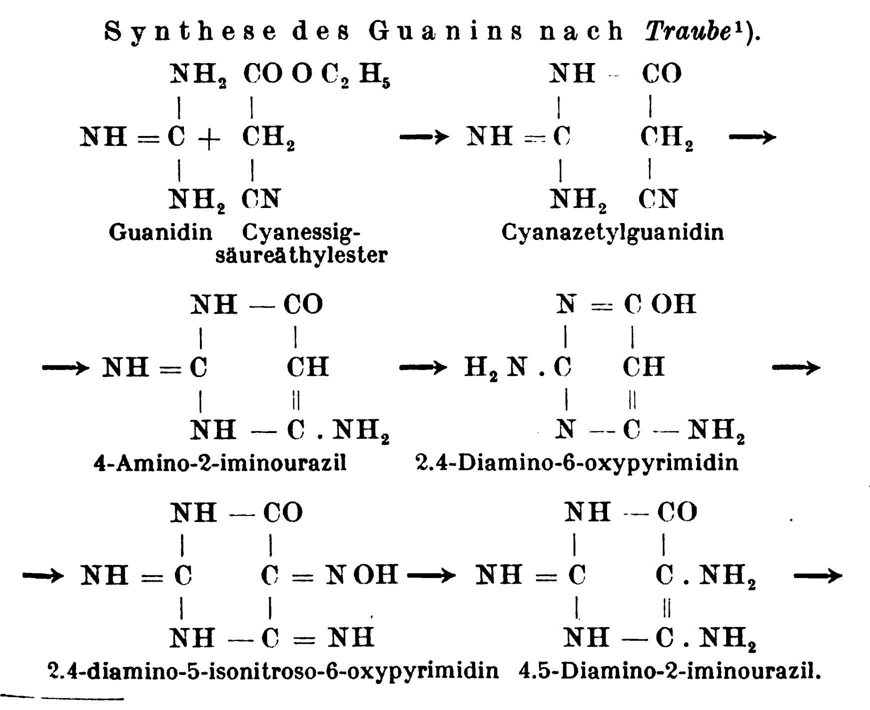
6-Oxy-2.8-dichlorpurin Chlorguanin Guanin.

10 *g* trockenes T r i c h l o r p u r i n (Synthese des Trichlorpurins aus Harnsäure siehe bei Adenin) werden in 140 cm^3 Normalkalilauge (3 Moleküle) gelöst und 3 Stunden auf 100° erwärmt. Es ist dabei vorteilhaft, den Zutritt der Luft zu beschränken. Die Flüssigkeit färbt sich schwach rosa. Wird dieselbe nach beendeter Operation mit Salzsäure übersättigt, so kristallisiert alsbald das neue Produkt in feinen rötlichgelb gefärbten Nadeln, welche meist in sternförmigen Aggregaten vereinigt sind. Dieselben werden nach zwölfstündigem Stehen in der Kälte filtriert. Die Ausbeute beträgt 80% des Trichlorpurins. Für die völlige Reinigung dient das Kaliumsalz. Um dasselbe zu bereiten, löst man in der für 1 Molekül berechneten Menge 0·5-Normalkalilauge unter Erwärmen, filtriert von einem geringen Rückstand und kühlt auf 0° ab, wobei das Salz in feinen Nadeln ausfällt, so daß die Flüssigkeit zu einem dicken Brei gesteht. Dasselbe wird scharf abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen, dann in warmem Wasser gelöst, die rötliche Flüssigkeit durch Kochen mit wenig Tierkohle entfärbt und das Filtrat mit Salzsäure übersättigt. Dann kristallisiert das 6-Oxy-2.8-dichlorpurin in völlig farblosen, schönen Nadeln. Bei dieser Reinigung bleibt ungefähr die Hälfte des Dichlorhypoxanthins in der Mutterlauge des Kaliumsalzes. Dasselbe läßt sich aber durch Ansäuern größtenteils daraus zurückgewinnen.

Ü b e r f ü h r u n g d e s 6-O x y-2.8-d i c h l o r p u r i n s i n C h l o r g u a n i n: 1 Teil feingepulvertes 6-Oxy-2.8-dichlorpurin wird mit 10 Teilen einer bei 0° gesättigten alkoholischen Ammoniaklösung im verschlossenen Gefäß sorgfältig umgeschüttelt, wobei aber keine vollständige Lösung eintritt, und dann 5 Stunden auf 150° erhitzt. Nach dem Erkalten ist wieder eine weiße voluminöse Masse abgeschieden. Der Röhreninhalt wird jetzt auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand mit kaltem Wasser ausgelaugt. Das unlösliche Produkt löst sich leicht in Alkali und Ammoniak und auch in heißen Mineralsäuren. Da aus diesen Lösungen immer nur amorphe Massen ausfallen, welche offenbar Gemenge sind, wird auf die Reinigung des Chlorguanins verzichtet und das Rohprodukt direkt in Guanin übergeführt. Zu diesem Zwecke wird das Rohprodukt fein gepulvert, mit der zehnfachen Menge Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1·96 übergossen und unter allmählichem Zusatz von Jodphosphonium ungefähr eine

halbe Stunde auf dem Wasserbade erhitzt, bis keine Abscheidung von Jod mehr bemerkbar ist. Da hiebei noch ein erheblicher Teil ungelöst bleibt, so wird zum Schluß über freiem Feuer gekocht, bis mit steigendem Siedepunkte der Flüssigkeit das feste Produkt mit Ausnahme von einigen schmutzigen Flocken in Lösung gegangen ist. Beim Erkalten scheidet sich ein kristallinisches Jodhydrat ab, welches nach sorgfältiger Abkühlung auf Glaswolle abgesaugt und mit wenig starkem Jodwasserstoff gewaschen wird. In der Mutterlauge bleibt nur wenig gelöst. Aus der wässerigen Lösung des Jodhydrates fällt durch Ammoniak die Base als farbloser, dichter Niederschlag. Die Ausbeute an Rohguanin beträgt 50% des angewandten Oxydichlorpurins. Die Base ist aber trotz des schönen Aussehens des Jodhydrates keineswegs rein. Sie enthält einen stickstoffreicheren Körper, welcher gegen Oxydationsmittel unempfindlicher ist und dessen völlige Entfernung gleichfalls Schwierigkeiten macht. Zur Reinigung wird das Rohguanin zunächst in der siebenfachen Menge 14%iger Salzsäure heiß gelöst und das beim Erkalten abgeschiedene Salz noch dreimal aus der gleichen Menge Salzsäure umkristallisiert, wobei ungefähr zwei Fünftel des Rohproduktes in den Mutterlaugen bleibt. Aus dem salzsauren Salz gewinnt man durch Fällen mit Ammoniak die freie Base.

Synthese des Guanins nach *Traube*[1]).



[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 1373 (1900).

```
          N = C . OH                HN -- CO
          |   |                     |     |
→  H2N -- C   C . NH2   →  H2N . C     C -- NH
          ||  ||                    ||    ||     >CH
          N -- C . NH2              N -- C -- N
```

2.4.5-Triamino-6-oxypyrimidin Guanin.

2.4-Diamino-6-oxypyrimidin: 40 *g* Guanidinchlorhydrat (oder auch das billigere Rhodanat) werden in nicht zu viel absolutem Alkohol gelöst und diese Flüssigkeit mit einer Auflösung von 10 *g* Natrium in absolutem Alkohol vermischt. Zu der vom ausfallenden Chlornatrium (beim Rhodanat fällt nichts aus) getrennten Lösung des freien Guanidins setzt man darauf ungefähr 48 *g* Cyanessigester. Die Flüssigkeit erwärmt sich alsbald ziemlich stark und die Ausscheidung eines kristallinischen Niederschlages beginnt. Nach 5 bis 6 Stunden filtriert man diesen, der aus fast reinem Cyanazetylguanidin besteht, ab und gewinnt durch Eindampfen des Filtrates das gleichzeitig entstandene 2.4-Diamino-6-oxypyrimidin. Beide Verbindungen werden durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt. Keine der beiden Verbindungen besitzt einen charakteristischen Schmelzpunkt. Zur Überführung des Cyanazetylguanidins in das isomere Pyrimidinderivat trägt man ersteres in stark verdünnte, heiße, wässerige Natronlauge ein und erhitzt rasch weiter zum Sieden, kühlt dann ab und versetzt mit Schwefelsäure in geringem Überschuß, wodurch das in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Sulfat der zyklischen Base gefällt wird. Auch das bei der Reaktion zwischen Guanidin und Cyanessigester direkt entstehende Pyrimidin gewinnt man für die weitere Verarbeitung zweckmäßig ebenfalls als Sulfat, indem man die, wie oben erwähnt, nach dem Abfiltrieren des Cyanazetylguanidins verbleibende alkoholische Flüssigkeit eindampft und dann mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser versetzt.

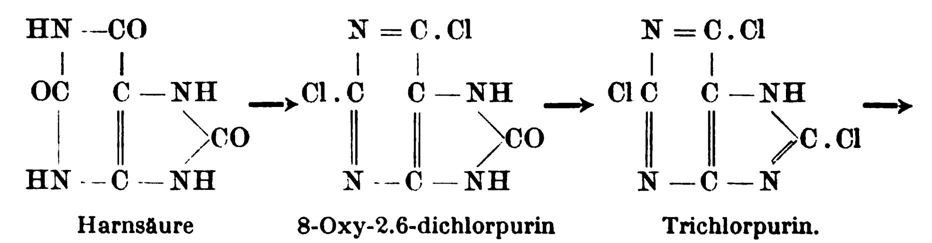
Isonitrosokörper: Löst man das Sulfat des 2:4-Diamino-6-oxypyrimidins in siedendem Wasser und fügt überschüssige Natriumnitritlösung zu, so scheidet sich fast augenblicklich als rosenroter Niederschlag die Isonitrosoverbindung aus. Dieselbe besteht aus mikroskopischen Nädelchen und ist chemisch rein. Bei Verarbeitung größerer Mengen des in Wasser schwer löslichen 2:4-Diamino-6-oxypyrimidins setzt man, um größere Flüssigkeitsmengen zu vermeiden, Natriumazetat hinzu, wodurch die Löslichkeit des Sulfates bedeutend erhöht wird. Die Reaktion der salpeterigen Säure tritt aber dann erheblich langsamer ein und es ist manchmal nötig, noch etwas verdünnte Schwefelsäure zur Vervollständigung der Reaktion hinzuzusetzen. Ausbeute 50 bis 60%.

2:4:5-Triamino-6-oxypyrimidin: Zur Reduktion des Isonitrosokörpers trägt man denselben fein gepulvert in die etwa 15- bis 20fache Menge heißen Wassers ein und fügt allmählich die dreifache Menge (auf angewendete Isonitrosoverbindung berechnet) käuflicher Ammoniumsulfidlösung kalt hinzu. Man erhitzt dann vorsichtig weiter bis zur beginnenden Reaktion, die unter lebhaftem Aufrollen und Abscheidung von viel Schwefel eintritt, bevor der Siedepunkt der Flüssigkeit erreicht ist. Schließlich erhitzt man zum Sieden und kocht bis zur Verjagung des Schwefelwasserstoffes, doch muß man sich überzeugen, ob der Schwefelniederschlag rein gelb ist oder noch Teilchen des Isonitrosokörpers beigemengt enthält. Ist dies der Fall, so muß noch etwas Schwefelammonium zugesetzt werden. Ist die Reaktion beendet, so saugt man vom Schwefel ab und läßt das Filtrat erkalten. Es scheidet sich dann aus demselben, falls es nicht allzu verdünnt ist, der größte Teil der Triaminoverbindung als schweres gelbliches Kristallpulver ab. Aus dem Filtrat von diesem gewinnt man den Rest des gebildeten Triamins als schwer lösliches Sulfat durch Zusatz verdünnter Schwefelsäure. Ausbeute 90%. Hat man bei der Reduktion des Isonitrosokörpers die letzten Reste des Schwefelwasserstoffes durch Kochen entfernt, so nimmt die ammoniakalische Lösung bei der Berührung mit der Luft durch Oxydation augenblicklich eine intensiv violette Farbe, ähnlich der einer Permanganatlösung an, was man vermeiden kann, wenn man der Lösung wieder eine Spur Schwefelammonium zusetzt. Für die weitere Verarbeitung auf Guanin ist die Base direkt nach der Reduktion genügend rein.

Guanin: Zur Überführung in das Guanin kann man sich des freien 2.4.5-Triamino-6-oxypyrimidins, wie man es direkt bei der Reduktion der Isonitrosoverbindung erhält, bedienen oder des schwefelsauren Salzes. Man löst die Base bezw. das Sulfat unter Zusatz der äquivalenten Menge ameisensauren Natriums in der acht- bis zehnfachen Menge etwa 90%iger Ameisensäure und kocht 4 bis 5 Stunden in einem Kolben am Rückflußkühler. Bisweilen scheidet sich ein Teil des gebildeten Guanins schon während des Kochens, vermutlich an Ameisensäure gebunden, aus und verursacht dann heftiges Stoßen. Man tut in diesem Falle gut, vom Niederschlag abzufiltrieren und das Filtrat von neuem zu kochen. Will man untersuchen, ob alles Triaminooxypyrimidin in Guanin über gegangen ist, so verdampft man eine kleine Probe des Reaktionsgemisches auf einem Uhrglase auf dem Wasserbade zur Trockne, setzt zum Rückstand einige Tropfen rauchender Salpetersäure und dampft von neuem ein, um zu sehen, ob nunmehr ein rein gelb gefärbter Rückstand hinterbreibt. Ist dies der Fall, so ist kein Triamin mehr vorhanden, das sich dadurch zu erkennen geben würde, daß der Rückstand an den Rändern nach dem Abrauchen

mit Salpetersäure rot und violett gefärbt sein würde. Ist die Umwandlung des Triamins in Guanin beendet, so wird der Inhalt des Kolbens in einer Schale auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht, der Rückstand in nicht zu verdünnte Schwefelsäure eingetragen und erhitzt, bis völlige Lösung erfolgt ist. Darauf wird unter Zusatz von Tierkohle noch einige Zeit weiter gekocht, schließlich filtriert und aus dem Filtrat durch Ammoniak gelblich gefärbtes Guanin gefällt. Zur völligen Reinigung wird es abermals unter Zugabe von Tierkohle in verdünnter Schwefelsäure gelöst und aus der filtrierten Flüssigkeit beim Erkalten als Sulfat gewonnen. Aus der Lösung des Sulfates wird durch Ammoniak chemisch reines Guanin niedergeschlagen.

Synthese des Hypoxanthins.



Harnsäure 8-Oxy-2.6-dichlorpurin Trichlorpurin.

6-Oxy-2.8-dichlorpurin Hypoxanthin.

Die Synthese des Trichlopurins aus Harnsäure ist bei der Synthese des Adenins beschrieben. Die Umwandlung des Trichlopurins in 6-Oxy-2.8-dichlorpurin geschieht auf die gleiche Weise wie bei der Synthese des Guanins ausgeführt wurde. Für die Darstellung des Hypoxanthins kann die rote Dichlorverbindung benützt werden. Man übergießt dieselbe mit der zehnfachen Menge Jodwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·98), wobei sie sich zusammenballt, fügt gepulvertes Jodphonium hinzu und schüttelt bei gewöhnlicher Temperatur, wobei die Reduktion ungefähr dreiviertel bis eine Stunde in Anspruch nimmt. Eventuell ist es nötig, die zusammengeballte Masse durch Verreiben zu zerkleinern. Der größere Teil der Substanz geht dabei in Lösung, während eine dunkle Jod-

verbindung übrigbleibt. Man erwärmt schließlich bei Gegenwart von Jodphosphonium, bis auch diese verschwunden und eine farblose Flüssigkeit entstanden ist. Beim Erkalten kristallisiert das Jodhydrat des Hypoxanthins, welches in kaltem, konzentriertem Jodwasserstoff schwer löslich ist. Da aber doch ein Teil desselben in Lösung bleibt, so ist es bequemer, die ganze Flüssigkeit zur Trockne zu verdampfen, den Rückstand in warmem Wasser zu lösen und mit Ammoniak zu übersättigen. Hiebei fällt das Hypoxanthin schon zum größten Teil aus. Man verdampft den Überschuß des Ammoniaks, läßt erkalten, filtriert und kristallisiert den Rückstand aus heißem Wasser unter Zusatz von wenig Tierkohle um.

Synthese des Hypoxanthins nach *Traube*[1]).

Die Synthese des Hypoxanthins kann auf die gleiche Weise durchgeführt werden wie die Synthese des Adenins nach *Traube* (siehe S. 133). Nun wird zur Darstellung des Hypoxanthins das Thioadenin nicht mit H_2O_2 oxydiert, sondern mit Salpetersäure. Eine Synthese des Hypoxanthins, die nicht über das Adenin führt, ist ebenfalls von *Traube* beschrieben, sie nimmt folgenden Verlauf.

```
 NH2  COO.C2H5        NH — CO              NH — C
 |    |               |    |               |    |
S=C   CH2      —→   S=C    CH      —→    S=C    C=NOH —→
 |    |               |    ||              |    |
 NH2  C≡N             NH — C=NH            NH — C=NH
Thioharn- Cyanessigester  4-Amino-6-oxy-2-thio-  Isonitrosokörper
stoff                     pyrimidin

        NH — CO                    NH — CO
        |    |                     |    |
—→    S=C    C.NH2      —→       S=C    C.NH.CHO  —→
        |    ||                    |    ||
        NH — C.NH2                 NH — C.NH2
  4.5-Diamino-6-oxy-            Formylverbindung
  2-Thiopyrimidin

        NH — CO                    NH — CO
        |    |                     |    |
—→    S=C    C — NH      —→        HC   C — NH
        |    ||    >CH             ||   ||    >CH
        NH — C — N                 N —— C — N
    6-Oxy-2-thiopurin              Hypoxanthin.
```

4-Amino-6-oxy-2-thiopyrimidin: 4.6 *g* Natrium werden in 100 bis 200 cm^3 absolutem Alkohol gelöst und zu der

[1]) *W. Traube:* Ann. **331**. 64 (1912).

Lösung 16 *g* fein gepulverter trockener Schwefelharnstoff und 22 *g* Cyanessigester gegeben. Das Gemisch wird sodann etwa 2 Stunden am Rückflußkühler auf dem Wasserbade im Sieden erhalten. Der in kaltem Alkohol ziemlich schwer lösliche Natriumcyanessigester geht beim Erwärmen bald in Lösung; nach kurzem Kochen beginnt aber das auch in heißem Alkohol schwer lösliche Natriumsalz des Aminooxythiopyrimidins als kristallinischer, sich rasch vermehrender Niederschlag auszufällen. Man filtriert ab, dampft das Filtrat ein, löst den verbleibenden Rückstand zusammen mit dem Niederschlag in Wasser und versetzt mit verdünnter Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion. Das Aminothiopyrimidin scheidet sich in feinen farblosen Nadeln aus. Ausbeute 25 bis 27 *g*.

Isonitrosokörper: Man löst 20 *g* des Aminothiourazils in 0·5 *l* Wasser, das etwa 5·5 *g* Natriumhydroxyd enthält, und fügt dazu 10 *g* Natriumnitrit und darauf 18 *g* Eisessig. Es scheidet sich zunächst das Aminothiourazil als sehr feiner Niederschlag wieder aus, auf den nun die allmählich frei werdende salpeterige Säure einwirkt. Es färbt sich zunächst gelblich, schließlich braun, und nach Verlauf einiger Stunden ist die Umsetzung beendet. Da der Niederschlag sich nur schwer absaugen läßt und zudem die freie Isonitrosoverbindung von Schwefelammonium wegen ihrer Schwerlöslichkeit nur ziemlich schwierig angegriffen wird, so führt man sie zweckmäßig gleich in das Ammoniumsalz über. Man bringt zu diesem Zwecke den noch in der Mutterlauge verteilten Isonitrosokörper durch Zusatz von Natronlauge in Lösung und fällt durch Hinzufügen einer hinreichenden Menge von Chlorammonium das Ammoniumsalz aus. Dieses bildet glänzende, braune Nädelchen, die sich leicht absaugen lassen und nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther und nachherigem Trocknen zur Weiterverarbeitung genügend rein sind. 21 *g* des Salzes aus 20 *g* Aminothiourazil.

4:5-Diamino-6-oxy-2-thiopyrimidin: Zur Reduktion trägt man das Ammoniumsalz des Isonitrosokörpers in nicht zu großen Anteilen in kochende, etwa 5%ige Ammoniumsulfidlösung ein, wobei sofort Auflösung erfolgt. Erst nachdem ein größerer Teil des Schwefelammoniums zur Reduktion verbraucht ist, beginnt die Abscheidung des Schwefels. Man fährt mit dem Eintragen des Isonitrosokörpers so lange fort, als noch in der Flüssigkeit oder in den beim Kochen sich entwickelnden Dämpfen Schwefelwasserstoff nachweisbar ist, bezw. man fügt nach Bedarf frisches Schwefelammonium in kleinen Portionen hinzu. Nach Beendigung der Reduktion soll jedenfalls keine irgend erhebliche Menge Schwefelwasserstoff in der Flüssigkeit vorhanden sein. Man trennt die dunkle, ammoniakalische Lösung, welche das Diaminothiourazil

enthält, möglichst rasch vom ausgeschiedenen Schwefel und säuert sie mit Ameisensäure nicht zu stark an, wodurch das in Wasser schwer lösliche Formiat der Base ausgefällt wird. Setzt man zu viel namentlich konzentrierte Ameisensäure zu, so gehen erhebliche Mengen des Formiates wieder in Lösung. Ausbeute 17 *g* Formiat aus 20 *g* Ammoniumsalz des Isonitrosokörpers.

Überführung in die Formylverbindung: Das auf die eben beschriebene Art gewonnene Formiat wird mit der 10- bis 15fachen Menge Ameisensäure (spezifisches Gewicht 1·12) am Rückflußkühler gekocht. Es tritt hiebei zu keinem Zeitpunkte eine klare Auflösung ein. Man unterbricht das Erhitzen nach Verlauf von etwa 2 bis 3 Minuten und trennt sodann den Niederschlag von der Flüssigkeit, die selbst nur wenig des Formylkörpers aufgelöst enthält und nochmals zur Überführung einer weiteren Menge Formiat in Formylkörper verwendet werden kann. Der Niederschlag wird durch Waschen mit Wasser und später Alkohol von der anhaftenden Ameisensäure befreit und zur Reinigung in heißem Ammoniak gelöst und durch Zusatz von Ameisensäure wieder ausgefällt. Arbeitet man hiebei in sehr verdünnter Lösung und behandelt diese mit Tierkohle, so erhält man den Formylkörper in völlig farblosen, durchsichtigen Prismen, während er aus konzentrierten Lösungen als dichter, kristallinischer Niederschlag gefällt wird, der schwach gelbliche Farbe besitzt.

Thiohypoxanthin: Einige Gramm des Formyldiaminothiourazils werden in der zur Bildung des Mononatriumsalzes erforderlichen Menge 8%iger Natronlauge gelöst und in der Lösung absoluter Alkohol, zumeist in kleinen Anteilen, gegeben, indem man nach jedesmaligem Zusatz prüft, ob sich durch Reiben der Gefäßwände mit einem Glasstabe eine Kristallabscheidung herbeiführen läßt. Hat einmal die Ausscheidung des Natriumsalzes in fester Form begonnen, so kann man dann den Alkohol bis zur völligen Ausfällung des Salzes rasch zusetzen. Man gewinnt es so als fein kristallinischen, nur sehr wenig gefärbten Niederschlag, während es durch sofortigen Zusatz von viel Alkohol zuerst ölig gefällt und nach dem Erstarren des Öls in ziemlich stark gefärbten Kristallen gewonnen wird. Das Salz wird abgesaugt, mit Alkoholäther gewaschen und an der Luft getrocknet. Es enthält, so dargestellt, 2 Moleküle Kristallwasser. Zur Überführung in das Natriumsalz des Thiohypoxanthins wird es fein gepulvert, und in einem flachen Gefäße im Luftbade allmählich auf 250 bis 255° erhitzt. Es entweicht hiebei zunächst das Kristallwasser und sodann das bei dem Übergange in das Purinderivat sich abspaltende Wasser, im ganzen 3 Moleküle. Das Natriumsalz der Formylverbindung backt beim Erhitzen zunächst zusammen, nimmt aber bald bedeutend an Volumen zu. Nach Beendigung der Umwandlung resultiert eine sehr spröde,

von Luftblasen durchsetzte und schwach gelb gefärbte Masse. Man bringt sie in Wasser, von welchem sie sehr leicht gelöst wird, erhitzt zum Sieden, fügt Tierkohle zu und versetzt nach dem Filtrieren mit Essigsäure. Das Thiohypoxanthin scheidet sich hiebei in gelben Nädelchen ab, und zwar in einer Menge von 6 bis 6·5 *g* bei Anwendung von 10 *g* des freien Formylkörpers.

Hypoxanthin: Man erhitzt eine Mischung von 4 *g* Thiohypoxanthin und 20 cm^3 25%ige Salpetersäure auf dem Wasserbade. Es setzt bald eine lebhafte Reaktion ein, die von einer stürmischen Entwicklung roter Dämpfe begleitet ist. Man fährt mit dem Erhitzen fort, bis die Gasentwicklung nur mehr schwach und verdünnt die klare, salpetersaure Lösung mit dem mehrfachen Volumen kalten Wassers, wodurch ein geringer flockiger Niederschlag zur Abscheidung gelangt. Das Filtrat von diesem wird mit Ammoniak übersättigt, auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand mit kaltem Wasser ausgelaugt, wobei Ammoniumsulfat- und -nitrat in Lösung gehen, während das noch etwas gefärbte Hypoxanthin zurückbleibt. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser erhält man es völlig weiß in kristallinischen Krusten in einer Ausbeute von 2 bis 2·5 *g* aus 4 *g* der Schwefelverbindung.

Synthese des Xanthins.

```
HN — CO                N = C . Cl                 N — C . Cl
|     |                |     |                    |     |
OC    C — NH    ——> Cl C     C — NH     ——> Cl C     C — NH      ——>
|     ||    >CO        ||    ||    >CO            ||    ||    >C . Cl
HN — C — NH            N — C — NH                 N — C — N
  Harnsäure         8-Oxy.2.6-dichlorpurin          Trichlorpurin
```

```
              N = C . O . C2H5              HN — C . O
              |     |                        |     |
——> C2H5O . C       C — NH        ——>       OC     C — NH
              ||    ||    >C . Cl            |     ||    >CH
              N — C — N                     HN — C — N
         2.6-Diäthoxy-8-chlorpurin                Xanthin.
```

10 *g* Trichlorpurin (Synthese des Trichlorpurins siehe bei Adenin) werden mit einer konzentrierten Lösung von 10 *g* Natrium in absolutem Alkohol im geschlossenen Gefäß 3 Stunden auf 100° erhitzt, wobei eine reichliche Abscheidung von Chlornatrium eintritt.

Man verdampft dann den Alkohol größtenteils auf dem Wasserbade, verdünnt den Rückstand mit Wasser und übersättigt die gelbe Lösung mit Essigsäure. Dabei scheidet sich eine voluminöse, aus feinen Nadeln bestehende Masse ab, welche nach dem Erkalten filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen wird. Die Ausbeute

beträgt ungefähr 80% vom Trichlorpurin. In der Mutterlauge ist infolge des Alkoholgehaltes noch eine kleine Menge desselben Körpers enthalten. Das Rohprodukt besteht zum allergrößten Teil aus dem 2.6-Diäthoxy-8-chlorpurin, enthält aber noch eine kleine Beimengung, deren Natur nicht festgestellt werden konnte. Die Reinigung des Diäthoxychlorpurins gelingt leicht durch einmaliges Umkristallisieren aus etwa 16 Teilen siedenden Azetons. Beim Abkühlen auf 0° fällt die Verbindung zum größten Teil in farblosen, feinen, verfilzten Nadeln aus, während der erwähnte Fremdkörper in der Mutterlauge bleibt. Die Ausbeute an reinem Präparat beträgt 60% des Trichlorpurins.

Überführung des 2.6-Diäthoxy-8-chlorpurins in Xanthin: Die Diäthoxyverbindung wird in der zehnfachen Gewichtsmenge farblosen Jodwasserstoffes (spezifisches Gewicht 1·96) bei Zimmertemperatur gelöst. Die Reduktion beginnt alsbald. Man fügt einen Überschuß fein gepulverten Jodphosphoniums hinzu und befördert die Wirkung desselben durch dauerndes Schütteln. Nach etwa dreiviertel Stunden ist bei kleineren Mengen die Reaktion beendet und eine fast farblose Lösung entstanden. Dieselbe enthält wahrscheinlich das zunächst entstandene Diäthoxypurin. Da dasselbe aber durch die starke Säure auch schon in der Kälte langsam gespalten wird, so fällt bei der Verarbeitung von größeren Mengen schon während der Reduktion das jodwasserstoffsaure Xanthin teilweise aus. Beim Erwärmen auf dem Wasserbade vollzieht sich diese Verwandlung vollständig, und es entsteht ein dicker Kristallbrei des Salzes. Man verdampft ohne zu filtrieren auf dem Wasserbade zur Trockne und zerlegt das zurückgebliebene Jodhydrat durch Zusatz von Ammoniak. Wenn der Überschuß des letzteren verdampft ist, verdünnt man wieder mit Wasser und filtriert das ausgeschiedene Xanthin. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Zur Reinigung wird das Xanthin abermals in verdünntem Ammoniak gelöst und durch Wegkochen des Ammoniaks wieder abgeschieden.

Vom 2.6-Diäthoxy-8-chlorpurin kann man auch über das Chlorxanthin (Kochen des 2.6-Diäthoxy-8-chlorpurins mit Salzsäure) zum Xanthin gelangen. Die direkte Reduktion des 2.6-Diäthoxy-8-chlorpurins ist die raschere Methode.

Synthese des Xanthins nach *W. Traube*[1]).

Zur Synthese des Xanthins kann man vom Guanin ausgehen, das nach *W. Traube* auf die S. 138 beschriebene Weise hergestellt wird. Das Guanin wird dann in heißer, verdünnter Schwefelsäure gelöst, Natriumnitrit zugesetzt, das ausgeschiedene, noch gefärbte Xanthin zur Reinigung in heißer, verdünnter Natronlauge gelöst

[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 1371, 3043 (1900).

und sodann bei Siedehitze durch Essigsäure als schwerer, leicht zu filtrierender, farbloser Niederschlag wieder gefällt.

Eine Synthese, die aus Harnstoff und Cyanessigsäure direkt zum Xanthin führt, wird nach *Traube* auf folgende Weise ausgeführt:

$$\begin{array}{ccccccccccc}
 & NH_2 & COOH & & NH - & CO & & NH - & CO & \\
 & | & | & & | & | & & | & | & \\
O = & C & CH_2 & \longrightarrow & CO & CH_2 & \longrightarrow & CH & CH & \longrightarrow \\
 & | & | & & | & | & & | & \| & \\
 & NH_2 & CN & & NH_2 & CN & & NH & C.NH_2 &
\end{array}$$

Harnstoff Cyanessigsäure Cyanacetylharnstoff 4-Amino-2.6-dioxypyrimidin

$$\begin{array}{ccccccc}
 & NH - & CO & & & N = & C\,OH \\
 & | & | & & & | & | \\
\longrightarrow & CO & C = N\,OH & \longrightarrow & OH.C & & C.NH_2 \longrightarrow \\
 & | & | & & & \| & \\
 & NH - & C = NH & & & N - & C.NH_2
\end{array}$$

Isonitrosoverbindung 4.5-Diamino-2.6-dioxypyrimidin

$$\begin{array}{cccccc}
 & NH - & CO & & NH - & CO \\
 & | & | & & | & | \\
\longrightarrow & CO & C.NH.CHO & \longrightarrow & CO & C - NH \\
 & | & \| & & | & | \quad \geqslant CH \\
 & NH - & C.NH_2 & & NH - & C - N
\end{array}$$

2.6-Dioxy-4-amino-5-formylaminopyrimidin Xanthin.

Die Synthese des 4.5-Diamino-2.6-dioxypyrimidins aus Harnstoff und Cyanessigsäure wird auf die gleiche Weise ausgeführt, wie sie bereits bei der Synthese der Harnsäure S. 129 beschrieben wurde. Zur Überführung des 4.5-Diamino-2.6-dioxypyrimidins in die Formylverbindung wird das schwefelsaure Salz des Pyrimidins unter Zusatz der äquivalenten Menge Natriumformiat mit dem 10- bis 20fachen Gewicht 90%iger Ameisensäure gekocht, wobei nach anfänglicher Lösung alsbald Abscheidung des Reaktionsproduktes eintritt. Nach Verlauf einiger Stunden läßt man erkalten, verdünnt mit Wasser und reinigt den von der Mutterlauge getrennten Niederschlag, der fast ausschließlich aus Formylkörper besteht, durch Lösen in Natronlauge und Fällen mit Essigsäure. Das Natriumsalz des Formylkörpers wird erhalten durch Lösen desselben in ein Molekulargewicht verdünnter Natronlauge und Eindampfen der Flüssigkeit oder schneller durch Fällen derselben mit einer genügenden Menge Alkohol.

Xanthin: Zur Überführung in Xanthin wird das Salz, wie man es durch Fällen seiner wässerigen Lösung mit Alkohol

erhält, meist bei 100° getrocknet und dann die Temperatur allmählich bis etwa 220° gesteigert. Man erhitzt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfindet, was nach ungefähr 2 Stunden der Fall ist, löst den schwach gefärbten, aus Xanthinnatrium bestehenden Rückstand in heißem Wasser, fügt Tierkohle zu und versetzt die filtrierte Lösung in der Siedehitze mit Essigsäure. Hiedurch wird das Xanthin noch etwas gefärbt ausgeschieden, und zwar in einer Menge, die 60 bis 70% vom Gewicht des angewandten Formylkörpers beträgt. Durch wiederholtes Lösen in Natronlauge und Fällen mit Essigsäure erhält man das Xanthin schließlich rein.

Xanthinderivate.

Synthese des Theophyllins, 1.3-Dimethyl-2.6-dioxypurin.

```
   CH3.NH    CO OH              CH3.N — CO
       |      |                      |    |
       CO — CH2        ⟶           CO  CH2  ⟶
       |      |                      |    |
   CH3.NH    CO OH              CH3.N — CO
Dimethylharnstoff  Malonsäure   Dimethylbarbitursäure

    CH3 N — CO                   CH3 N — CO
        |    |                       |    |
 ⟶     CO   C = N OH    ⟶          CO   C.NH2    ⟶
        |    |                       |    |
    CH3 N — CO                   CH3 N — CO
    Dimethylviolursäure          Dimethyluramil

  CH3 N — CO                       CH3.N — CO
      |    |                           |    |
⟶    CO   C.NH.CO.NH2  ⟶             CO   C — NH      ⟶
      |    |                           |    ||    ⩾CO
  CH3 N — CO                       CH3.N — C — NH
  Dimethylpseudoharnsäure          1.3-Dimethylharnsäure

   CH3.N — CO                      CH3 N — CO
       |    |                          |    |
⟶     CO   C — NH        ⟶           CO   C — NH
       |    ||    ⩾C.Cl               |    |    ⩾CH
   CH3.N — C — N                   CH3.N — C — N
   8-Chlortheophyllin              Theophyllin.
```

Die Darstellung der 1.3-Dimethylharnsäure geschieht nach der gleichen Vorschrift, wie sie bei der Darstellung der Harnsäure gegeben wurde, nur daß man als Ausgangsmaterial Dimethyl-

harnstoff nimmt. Bei der Darstellung der Dimethylbarbitursäure ist zu beachten, daß man meist Malonsäure mit Phosphoroxychlorid vermischt[1]). Die entstehende Flüssigkeit (Malonsäurechlorid) gibt mit Dimethylharnstoff die Dimethylbarbitursäure. Das entstehende Rohprodukt ist mit Schwefelkohlenstoff und dann mit Wasser zu waschen. Hierauf wird es mit Wasser umkristallisiert. Die Umwandlung der 1.3-Dimethylbarbitursäure in 1.3-Dimethylharnsäure geschieht in gleicher Weise, wie es bei der Verwendung der Barbitursäure zu Harnsäure beschrieben wurde.

Verwandlung von 1.3-Dimethylharnsäure in Chlortheophyllin[2]): 1 Teil reine, scharf getrocknete, nur sehr fein gepulverte Dimethylharnsäure wird mit 2 Teilen Phosphorpentachlorid und 4 Teilen Phosphoroxychlorid im geschlossenen Rohre möglichst gut vermischt und auf 150° erhitzt. Dabei ist es vorteilhaft, während der ersten Stunde des Erhitzens den Röhreninhalt durch Schütteln möglichst zu mischen, um das Zusammenbacken der Dimethylharnsäure zu verhindern. Nach etwa dreiviertel Stunden ist dieselbe zum größten Teil gelöst und die Flüssigkeit braun gefärbt, bald darauf beginnt die Kristallisation des Chlortheophyllins, dessen feine Nadeln schließlich die ganze Flüssigkeit erfüllen. Nach zweieinhalbstündigem Erhitzen läßt man erkalten, trennt die Kristalle von der tiefdunklen Mutterlauge durch Absaugen und wäscht dieselben mit Äther. Das schmutzig-graugelbe Produkt wird mit der zehnfachen Menge absolutem Alkohol ausgekocht, wobei ein verhältnismäßig kleiner Rückstand bleibt. Aus dem Filtrate scheidet sich in der Kälte das Chlortheophyllin langsam in feinen Nadeln ab. Die eingedampfte Mutterlauge liefert eine zweite Kristallisation. Ausbeute 45 bis 50% der angewandten Dimethylharnsäure. Zur Reinigung wird das Chlortheophyllin mit Tierkohle in schwach alkalischer Lösung kurze Zeit erwärmt, aus dem Filtrat durch Salzsäure wieder gefällt und schließlich aus heißem Azeton umkristallisiert. Schmelzpunkt unscharf gegen 300° unter Zersetzung.

Verwandlung des Chlortheophyllins in Theophyllin: Chlortheophyllin wird mit der achtfachen Menge starker Jodwasserstoffsäure auf dem Wasserbade erwärmt. Unter öfterem Umschütteln wird gepulvertes Jodphosphonium zugesetzt. Nach 15 bis 20 Minuten ist die Reduktion des Chlortheophyllins beendet, was leicht an der Farbe der Lösung zu erkennen ist. Beim Eindampfen der Flüssigkeit auf dem Wasserbade bleibt jodwasserstoffsaures Theophyllin als schwach gefärbte Kristallsäure zurück.

---

[1]) *Mulder*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **12**. 468; *Tellrow*: ebenda. **27**. 3082 (1894).

[2]) *Emil Fischer* und *L. Ach*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**. 3135 (1895).

Man löst das Salz in Wasser, fügt Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion hinzu und verdampft den Überschuß des letzteren. Beim Abkühlen fällt dann das Theophyllin kristallinisch aus. Es wird aus der achtfachen Menge heißen Wassers unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert.

Synthese des Theophyllins nach *Traube*[1]).

Fein gepulverter, trockener Dimethylharnstoff wird in Portionen von 5 *g* in einem Becherglase mit der gleichen Gewichtsmenge Cyanessigsäure und etwa 10 *g* Pyrimidin versetzt. Durch Erwärmen stellt man zunächst eine homogene Lösung dar, kühlt diese wieder ab und läßt sodann ganz langsam 5 *g* Phosphoroxychlorid zutropfen. Die Flüssigkeit muß hiebei stets lebhaft bewegt werden und etwa eintretende Erhitzung durch Eintauchen des Gefäßes in Eiswasser vermieden werden. Es resultiert ein brauner Sirup, der auch mit wenig Wasser eine klare Lösung gibt. In derselben ist das entstandene 1.3-Dimethyl-4-amino-2.6-dioxypyrimidin als salzsaures oder phosphorsaures Salz vorhanden. Um die freie Base zu gewinnen, dampft man die Lösung unter stets erneutem Zusatz von Ammoniak ein, bis alles Pyridin daraus vertrieben ist, und stellt die ammoniakalische Flüssigkeit sodann zur Kristallisation hin. Hiebei scheidet sich die Base in kompakten, meist stark gefärbten Kristallen im Verlaufe einiger Stunden ab. Gewichtsmenge der Base meistens größer als das Gewicht des angewandten Dimethylharnstoffes. Nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser mit Hilfe von Tierkohle ist die Verbindung rein und farblos.

Isonitrosoderivat: Zur Überführung in das Isonitrosoderivat wird der Körper zunächst in heißem Wasser, welches die nötige Menge Natriumnitrit enthält, aufgelöst. Setzt man darauf zu der Flüssigkeit verdünnte Essigsäure, so färbt sie sich sogleich rot, und es beginnt die Kristallisation der Isonitrosoverbindung. Die Abscheidung des in schönen dunkelroten Täfelchen ausfallenden Körpers ist erst nach etwa 24 Stunden beendet und die Flüssigkeit ist dann fast farblos geworden. Ausbeute 11 *g* aus 10 *g* Ausgangsmaterial.

1.3-Dimethyl-4.5-diamino-2.6-dioxypyrimidin: Die Reduktion des Isonitrosokörpers beim Behandeln mit warmem Schwefelammonium erfolgt fast momentan. Man setzt allmählich so viel Schwefelammonium zu, bis die roten Kristalle des Isonitrosokörpers völlig verschwunden sind, kocht den etwaigen Überschuß des Schwefelwasserstoffes weg und filtriert noch heiß vom Schwefel ab. Durch vorsichtiges Eindampfen des Filtrates, welches das in

[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3052 (1900).

Wasser leicht lösliche, neue Diamin enthält, gewinnt man dieses in harten, etwas gelb gefärbten Kristallkrusten. Aus Alkohol umkristallisiert, feine Nädelchen von Schmelzpunkt 209°. Durch Kochen des Diamins mit der mehrfachen Gewichtsmenge 90%iger oder auch noch etwas verdünnterer Ameisensäure erhält man reines Formylderivat in glänzenden, in heißem Wasser leicht löslichen Nädelchen. Schmelzpunkt 252°.

Theophyllin: Zur Gewinnung des Theophyllins in größerer Menge erhitzt man den Formylkörper auf 250 bis 260° in einem Trockenkasten und kristallisiert den Rückstand aus Wasser um. Man erhält so das Theophyllin in einer Ausbeute von 60% aus dem Formylkörper. Aus Wasser umkristallisiert, schmilzt das Theophyllin bei 264°. Nach einem Verfahren der Farbenfabriken *F. Bayer & Co.*[1]) geht auch die Umlagerung der Formylverbindung in Theophyllin glatt durch Erwärmen mit Alkalien auf dem Wasserbade vor sich.

Synthese des Theobromins nach *E. Fischer*[2]).

```
HN — CO                  HN — CO                    HN — CO
 |    |                   |    |                     |    |
OC    C — NH        →    OC    C — NH         →     OC    C — NH       →
 |    ||    >C = O        |    ||    >CO             |    ||    ≥C.Cl
HN — C — NH            CH3.N — C — NH              CH3N — C — N
  Harnsäure             3-Methylharnsäure          3-Methyl-8-chlorxanthin

          HN — CO                         HN — CO
           |    |                          |    |
  ⟶       OC    C — N.CH3       ⟶         OC    C — N.CH3
           |    ||    ≥C.Cl                |    ||    ≥CH
        CH3N — C — N                   CH3.N — C — N
         8-Chlortheobromin                 Theobromin.
```

20 Teile Harnsäure werden in 1300 Teilen Wasser und 240 Teilen Normalkalilauge gelöst und mit 38 Teilen Jodmethyl im Autoklaven unter fortwährender Bewegung der Flüssigkeit 2 Stunden auf zirka 100° C erhitzt. Die mit wenig Salzsäure versetzte Lösung scheidet beim Erkalten die Monomethylharnsäure als kristallinisches Pulver ab. Die Ausbeute beträgt etwa 80% der angewandten Harnsäure.

3-Methylchlorxanthin: 1 Teil getrocknete und fein gepulverte 3-Methylharnsäure (α-Methylharnsäure) wird mit

---

[1]) D. R. P. Nr. 138.444 vom 1. I. 1902 (19. I. 1903).

[2]) *E. Fischer*: Patentschrift vom 22. März 1896; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**. 1980 (1898).

8·5 Teilen Phosphoroxychlorid im geschlossenen Gefäß unter steter Bewegung auf 130 bis 140° erhitzt, bis eine klare, brennrote Lösung entstanden ist. Je nach dem Grade der Verteilung und der mechanischen Bewegung sind hiezu 5 bis 9 Stunden erforderlich. Die Lösung wird dann im Vakuum zur Entfernung des Phosphoroxychlorids möglichst vollständig eingedampft und der braune, firnisartige Rückstand mit der 20fachen Menge Alkohol 2 bis 3 Stunden am Rückflußkühler erwärmt. Dabei entsteht anfangs eine klare Lösung, aus welcher sich aber bald das Methylchlorxanthin als körnige, gelbe Kristallmasse abscheidet. Die Gewinnung desselben aus dem firnisartigen Rohprodukt kann übrigens auch durch Behandlung mit Wasser geschehen, wobei meist unter lebhafter Erwärmung Lösung erfolgt und dann nach einiger Zeit die Kristallisation des Methylchlorxanthins eintritt. Das Produkt wird zunächst in verdünnter Natronlauge heiß gelöst, mit Tierkohle behandelt, durch Schwefelsäure wieder ausgefällt und dann aus heißem Wasser, wieder unter Zusatz von Tierkohle, umkristallisiert, bis es farblos geworden ist.

Chlortheobromin: Die Verwandlung des 3-Methylchlorxanthins in Chlortheobromin läßt sich in alkalischer Lösung sowohl mit Jodmethyl wie mit methylschwefelsaurem Kali ausführen. Bei Anwendung des ersteren löst man 11 *g* Methylchlorxanthin in 66 *cm*³ Normalkalilauge, fügt 10 *g* Jodmethyl ($1^1/_3$ Moleküle) hinzu und erhitzt im geschlossenen Rohr unter dauerndem Schütteln 3 Stunden auf 90°. Schon während der Operation scheidet sich Chlortheobromin kristallinisch ab. Im zweiten Falle wird 1 *g* Methylchlorxanthin wiederum in 6 *cm*³ Normalkalilauge gelöst und nach Zusatz von 1·2 *g* methylschwefelsaurem Kalium im geschlossenen Rohr 4 bis 5 Stunden auf 140 bis 150° erhitzt. Auch hier fällt das Chlortheobromin schon in der Wärme aus. Zur Reinigung wird das Produkt in Alkali oder Ammoniak gelöst und durch verdünnte Säuren oder durch Wegkochen des Ammoniaks wieder gefällt. Aus Wasser umkristallisiert, schmilzt die farblose Verbindung bei 291°.

Theobromin: Die Reduktion der Chlorverbindung zum Theobromin gelingt am leichtesten mit Jodwasserstoff. Man erwärmt die Verbindung mit der achtfachen Menge Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1·96 unter Zusatz von Jodphosphonium auf dem Wasserbade, wobei nach 15 bis 20 Minuten eine klare, farblose Lösung entsteht. Beim Verdampfen derselben bleibt das Theobromin-Jodhydrat in farblosen Kristallen zurück. Dieselben werden durch Ammoniak zerlegt, das überschüssige Ammoniak weggedampft und der Rückstand mit kaltem Wasser gewaschen. Durch Umkristallisieren des Rohproduktes aus heißem Wasser erhält man das Theobromin in farblosen Kristallen. Schmelzpunkt 345°.

Synthese des Theobromins nach *W. Traube*[1]).

```
NH2 CO OH            NH  — CO              HN — CO
 |   |                |     |               |    |
OC + CH2      —→     OC    CH2      —→     OC   CH      —→
 |   |                      |               |    ||
CH3NH CN             CH3 . NH  CN         CH3 . N — C . NH2
```

Methyl-harnstoff, Cyanessig-säure — Cyanacetylmethyl-harnstoff — 3-Methyl-4-amino-2.6-dioxypyrimidin

```
        NH — CO                   NH — CO
        |     |                   |     |
 —→     OC    C N OH    —→        OC    C . NH2     —→
        |     |                         ::
      CH3 . N — C = NH            CH3N — C . NH2
```

3-Methyl-4-amino-5-isonitroso-2.6-dioxypyrimidin — 3-Methyl-4.5-diamino-2.6-dioxypyrimidin

```
         NH — CO                             NH — CO
         |     |                             |     |
 —→      OC    C . NH . CHO     —→           OC    C — NH       —→
         |     ||                            |     ||    ≥CH
      CH3 . N — C . NH2                   CH3N —   C — N
```

Formylderivat — 3-Methylxanthin

```
              NH — CO
              |     |
       —→     OC    C — N . CH3
              |     ||    ≥CH
          CH3 . N — C — N
```

Theobromin.

Man vermischt in einem Becherglas 10 *g* trockene Cyanessigsäure mit dem gleichen Gewicht trockenen gepulverten Methylharnstoffes und fügt dazu noch 20 *g* Pyridin. Man erwärmt nun gelinde, bis eine klare Lösung entstanden ist, kühlt wieder ab und läßt ganz langsam und tropfenweise 10 *g* Phosphoroxychlorid zufließen, während man die Flüssigkeit im Becherglase lebhaft umschüttelt. Die Reaktion vollzieht sich unter starker Wärmeentwicklung, und schließlich resultiert ein honiggelber, zäher, mitunter allmählich kristallinisch erstarrender Sirup. Versetzt man denselben nach dem Erkalten mit dem gleichen Volumen Wasser, so wird der bei der Reaktion entstandene Cyanacetylmethylharnstoff in fast farblosen Kristallen abgeschieden. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser ist der Körper rein. Ausbeute 11 *g*.

3-Methyl-4-amino-2.6-dioxypyrimidin: 4 *g* des fein gepulverten Cyanacetylmethylharnstoffes werden in 12 cm^3

---

[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3047 (1900).

20%iger Natronlauge eingetragen, wobei nach kurzer Zeit das Natriumsalz des Harnstoffes in glänzenden Blättchen sich ausscheidet. Diese gehen nach einiger Zeit spontan wieder in Lösung, die Flüssigkeit erwärmt sich und erstarrt plötzlich zu einem Brei feiner, seidenlglänzender Nadeln, die das Natriumsalz der zyklischen Verbindung vorstellen. Man gewinnt diese letztere selbst durch Übersättigen des alkalischen Reaktionsproduktes mit Essigsäure. Durch Umkristallisieren aus Wasser erhält man reine, farblose Kristalle. Ausbeute 3 bis 3·5 *g*.

Isonitrosokörper: Die Verbindung wird in siedend heißem Wasser gelöst oder suspendiert und darauf die äquivalente Menge Natriumnitrat und schließlich Essigsäure in geringem Überschusse zugegeben. Die Flüssigkeit färbt sich rot, alsbald beginnt die Abscheidung würfelförmiger, purpurroter Kristalle. Nach einer Stunde ist die Abscheidung beendet. Zur weiteren Verarbeitung ist der Körper rein genug.

3-Methyl-4.5-diamino-2.6-dioxypyrimidin: Man trägt den Isonitrosokörper in reine, verdünnte Schwefelammoniumlösung ein. Es erfolgt momentan unter Aufwallung der Flüssigkeit und massenhafter Abscheidung von Schwefel die Reaktion. Hatte man von vornherein zu wenig Reduktionsmittel genommen, so fügt man so lange davon zu, bis die letzten Partikel der roten, Kristalle verschwunden sind und die Flüssigkeit rein gelb ist. Da das entstandene Diamin in Wasser sehr schwer löslich ist, so mischt es sich dem Schwefelniederschlage bei und muß von diesem getrennt werden. Man saugt deshalb den Niederschlag von der Flüssigkeit, die nur Spuren des Diamins enthält, ab und behandelt ihn mit verdünnter Salzsäure in der Wärme. Die saure Lösung, welche das Pyrimidin als salzsaures Salz enthält, wird abfiltriert und das Filtrat mit Ammoniak übersättigt. Die Diaminobase wird hiedurch als gelbliches schweres Kristallpulver abgeschieden, während die überstehende Flüssigkeit sich grün färbt. Ausbeute 6 bis 6·5 *g* Diaminobase aus 8 *g* Isonitrosokörper. Aus Wasser einmal umkristallisiert, ist sie rein.

Formylkörper: Man kocht das Diamin mit der ungefähr vierfachen Gewichtsmenge 90%iger Ameisensäure etwa 2 Stunden lang. Aus der zunächst klaren Lösung scheidet sich das Reaktionsprodukt nach kurzer Zeit aus. Zur vollständigen Gewinnung desselben versetzt man die Flüssigkeit nach dem Erkalten mit ungefähr dem doppelten Volumen Wasser und läßt sie eine Zeitlang in der Kälte stehen. Die Gewichtsmenge des erhaltenen Formylkörpers entspricht dem Gewicht der angewandten Base.

Die Darstellung des Formylkörpers des 1·3-Dimethyl-4.5-diamino-2.6-dioxypyrimidins wird bei der Synthese des Theo-

3.-Methylxanthin. Man löst den Formylkörper in Natronlauge, welche genau ein Mol.-Gew. Natron enthält und dampft die erhaltene Flüssigkeit auf dem Wasserbade ein. Es hinterbleibt das Natriumsalz als gelbliche Krystallkruste. Für die Verarbeitung auf 3-Methylxanthin bringt man dieses Salz in den Trockenkasten und setzt es einer allmählich bis auf 220° gesteigerten Temperatur aus. Der Rückstand wird sodann in nicht zu viel heißem Wasser gelöst und durch Essigsäure das 3-Methylxanthin in feinen seidenglänzenden Nädelchen ausgefällt, die nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser völlig rein sind. Aus 5 *g* Formylverbindung 3 *g* 3-Methylxanthin.

Überführung des 3-Methylxanthins in Theobromin: 3 *g* Methylxanthin werden mit der 1$^1/_3$ Molekülen entsprechenden Menge Kalilauge und Jodmethyl in wässeriger Lösung etwa 3 Stunden unter stetem Umschütteln im geschlossenen Rohr auf 80° erhitzt. Das nach dem Erkalten ausgeschiedene Theobromin wird durch Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt.

Synthese des Kaffeins nach *E. Fischer*.

```
HN — CO                HN — CO                   HN — CO
|    |                  |    |                     |    |
OC   C — NH   ⟶      OC   C — NH      ⟶        OC   C — NH    ⟶
|    ‖    >CO          |    ‖    >CO              |    ‖    ⪖Cl.C
HN — C — NH        CH3.N — C — NH           CH3.N — C — N
  Harnsäure          3-Methylharnsäure        3-Methyl-8-chlorxanthin

          HN — CO                       CH3.N — CO
          |    |                            |    |
  ⟶     OC   C — N.CH3       ⟶          OC   C — N.CH3     ⟶
          |    ‖    ⪖C.Cl                   |    ‖    ⪖C.Cl
     CH3.N — C — N                      CH3.N — C — N
      8-Chlortheobromin                    8-Chlorkaffein

                    CH3N — CO
                      |     |
            ⟶       OC    C — N.CH3
                      |     ‖     ⪖CH
                  CH3.N — C — N
                        Kaffein.
```

8-Chlortheobromin: Die Darstellung des Chlortheobromins geschieht auf die gleiche Weise, wie dies bei der Synthese des Theobromins, S. 151, beschrieben wurde.

8-Chlorkaffein: 2 *g* Chlortheobromin werden in 11·2 *cm*³ Normalkalilauge (etwas mehr als 1 Molekül) gelöst und nach Zusatz

von 1·6 *g* Jodmethyl im geschlossenen Rohr unter dauernder Bewegung der Flüssigkeit 3 Stunden auf 90° erwärmt, wobei sehr bald Kristallisation des Chlorkaffeins beginnt. Dasselbe wird nach dem Erkalten filtriert und mit wenig verdünnter Natronlauge gewaschen, wieder filtriert und mit Wasser gewaschen. Die Ausbeute beträgt 95% des angewandten Chlortheobromins. Aus der Mutterlauge können noch weitere 5% durch Ausschütteln mit Chloroform isoliert werden. Aus Wasser umkristallisiert, ist es schneeweiß. Schmelzpunkt 187 bis 188°.

Kaffein: Das Chlorkaffein wird mit der achtfachen Menge Jodwasserstoff vom spezifischen Gewicht 1·96 unter Zusatz von Jodphosphonium auf dem Wasserbade erwärmt, bis klare Lösung eingetreten ist. Beim Verdampfen der Lösung bleibt Kaffeinjodhydrat in farblosen Kristallen zurück. Diese werden durch Ammoniak zerlegt, das überschüssige Ammoniak weggedampft und der Rückstand mit kaltem Wasser gewaschen. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser erhält man das Produkt in farblosen Kristallen.

Synthese des Kaffeins nach *W. Traube*[1]).

$$
\begin{array}{c}
CH_3NH \\ | \\ OC \\ | \\ CH_3.NH
\end{array}
\longrightarrow
\begin{array}{c}
COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CN
\end{array}
\longrightarrow
\begin{array}{cc}
CH_3N & -\,CO \\ | & | \\ OC & CH_2 \\ | & | \\ CH_3.NH & CN
\end{array}
\longrightarrow
\begin{array}{cc}
CH_3N & -\,CO \\ | & | \\ OC & CH_2 \\ | & | \\ CH_3N & -\,C.NH_2
\end{array}
\longrightarrow
$$

Dimethylharnstoff — Cyanessigsäure — Cyanacetyldimethylharnstoff — 1.3-Dimethyl 4-amino-2.6-dioxypyrimidin

$$
\longrightarrow
\begin{array}{ccc}
CH_3 & -\,N & -\,CO \\ & | & | \\ & OC & C=NOH \\ & | & | \\ CH_3 & N & -\,C=NH
\end{array}
\longrightarrow
\begin{array}{cc}
CH_3N & -\,CO \\ | & | \\ OC & C.NH_2 \\ | & \| \\ CH_3N & -\,C.NH_2
\end{array}
\longrightarrow
\begin{array}{cc}
CH_3N & -\,CO \\ | & | \\ OC & C.NH.CHO \\ | & \| \\ CH_3N & -\,C.NH_2
\end{array}
$$

1.3-Dimethyl 4-amino-5-isonitroso 2.6-dioxypyrimidin — 1.3-Dimehyl 4·5diamino 2.6-dioxypyrimidin — Formylderivat

$$
\longrightarrow
\begin{array}{cccc}
CH_3 & -\,N & -\,CO & \\ & | & | & \\ & OC & C & -\,N.CH_3 \\ & | & \| & \geqslant CH \\ CH_3 & -\,N & -\,C & -\,N
\end{array}
$$

Kaffein.

[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3047 (1900).

Die Darstellung des Formylkörpers des 1·3-Dimethyl-4.5-diamino-2.6-dioxyprimidins wird bei der Synthese des Theophyllins, S. 148, beschrieben. Um diesen Formylkörper in Kaffein überzuführen, kocht man ihn unter Zusatz eines Molekulargewichtes Natriumäthylat in absolut alkoholischer Lösung einige Stunden mit einem kleinen Überschuß von Jodmethyl am Rückflußkühler. Die Lösung in absolutem Alkohol wird am besten so verdünnt genommen, daß eine Ausscheidung des Natriumsalzes in gelinder Wärme wenigstens nicht erfolgt. Es erfolgt durch diese Operation nicht nur Ersatz eines Wasserstoffatoms durch Methyl, sondern gleichzeitig erfolgt auch Ringschluß unter Abspaltung eines Moleküls Wasser. Durch Einengen der Flüssigkeit erhält man das Kaffein in langen, seidenglänzenden Nadeln. Aus Alkohol umkristallisiert, ist der Schmelzpunkt 228 bis 229°.

Synthese des Heteroxanthins[1]).

```
    HN — CO                          N = C . Cl
    |    |                           |   |
    OC   C — N . CH3      —>       Cl C  C — N . CH3   —>
    |    ||     >CH                  ||  ||     >CH
 CH3 N — C — N                       N — C — N
     Theobromin                  7-Methyl-2.6-dichlorpurin

                  HN — CO
                  |    |
             —>   OC   C — N . CH3
                  |    ||     >CH
                  HN — C — N
        7-Methyl-2.6-dioxypurin (Heteroxanthin).
```

7-Methyl-2.6-dichlorpurin: 10 *g* Theobromin werden mit 100 *g* frisch destilliertem Phosphoroxychlorid im geschlossenen Rohr im Ölbade während 3 Stunden auf 140° erhitzt. Bei öfterem Umschütteln findet nach 1½ bis 2 Stunden klare Lösung statt. Nach dem Erkalten ist kein Druck vorhanden. Aus der schwach braunen Flüssigkeit wird nun das Phosphoroxychlorid bei einem Druck von 15 bis 20 *mm* aus dem Wasserbade möglichst vollständig abdestilliert und der amorphe, in der Wärme dickflüssige Rückstand mit 150 cm^3 kaltem Wasser übergossen. In dem Maße, wie das Wasser mit dem Produkte in Berührung kommt, beginnt die Abscheidung von fast farblosen Kristallen. Tritt dabei stärkere Erwärmung ein, so kühlt man durch kaltes Wasser. Wenn die Umwandlung des amorphen Produktes vollendet ist, kühlt man zur

[1]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2400 (1897).



Vervollständigung der Kristallisation auf 0° ab, filtriert und wäscht mit kaltem Wasser aus. Das Rohprodukt ist ein Gemisch von Methyldichlorpurin und einem anderen, in Alkali löslichen Produkt. Man laugt daher die Masse mit kalter, stark verdünnter Natronlauge aus und kristallisiert den filtrierten und ausgewaschenen Rückstand aus heißem Wasser. Ausbeute 30% des angewandten Theobromins. Aus Wasser umkristallisiert, feine farblose Nadeln. Schmelzpunkt 196 bis 197°.

Heteroxanthin: Das 7-Methyl-2.6-dichlorpurin wird mit der zehnfachen Menge Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·19 im geschlossenen Rohr 3 Stunden auf 120 bis 125° erhitzt. Es entsteht eine schwach gelblich gefärbte, klare Lösung, welche beim Verdampfen auf dem Wasserbade das Hydrochlorat des Methylxanthins in schönen, wenig gefärbten Prismen zurückläßt. Zur Isolierung der Base werden die Kristalle mit verdünntem Ammoniak übergossen und nach dem Verdampfen des überschüssigen Ammoniaks die schwer lösliche Base abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle erhält man dieselbe als farbloses, undeutlich kristallinisches Pulver. Zur Darstellung eines ganz reinen Präparates wird dasselbe in der 20fachen Menge heißen Wassers suspendiert und Natronlauge bis zur völligen Lösung hinzugefügt. Man kocht bis zur Entfärbung mit wenig Tierkohle und läßt das Filtrat erkalten. Nach einigen Stunden ist das Salz in schönen farblosen Kristallen ausgefallen. Das Natriumsalz wird in heißer wässeriger Lösung mit Essigsäure zerlegt und die abgeschiedene Base nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert.

Synthese des Paraxanthins[1]) (1.7-Dimethylxanthins).

```
    HN — CO                          N = C . Cl
    |    |                           |   |
    OC   C — N . CH3     —→      Cl C   C — N . CH3     —→
    |    ||      >CH                ||   ||      >CH
 CH3. N — C — N                      N — C — N
     Theobromin                 7-Methyl-2.6-dichlorpurin

      HN — CO                     CH3 . N — CO
      |    |                            |    |
 —→ Cl . C   C — N . CH3    —→      Cl C    C — N . CH3    —→
      ||   ||      >CH                ||    ||      >CH
      N — C — N                       N — C — N
 7-Methyl-6-oxy-2-chlorpurin    1.7-Dimethyl-6-oxyl-2-chlorpurin
```

[1]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2400 (1897).

```
        CH₃ — N — CO
              |    |
   —→       OC    C ··· N . CH₃
              |    ||     ≥CH
            HN · - C — N
```

1·7-Dimethylxanthin (Paraxanthin).

Die Synthese des 7-Methyl-2.6-dichlorpurins ist bei der Synthese des Heteroxanthins, S. 156, beschrieben.

7-Methyl-6-oxy-2-chlorpurin: 10 *g* zerriebenes Methyldichlorpurin werden in 100 cm^3 kochenden Wassers suspendiert und die für 2 Moleküle berechnete Menge Natriumhydroxyd, d. h. 4 *g* in Form starker Natronlauge hinzugegeben. Beim Umschütteln tritt alsbald klare Lösung ein, wodurch das Ende der Reaktion angezeigt wird. Aus der abgekühlten Flüssigkeit fällt beim Übersättigen mit Essigsäure das Methyloxychlorpurin sofort kristallinisch aus. Das Produkt ist noch unrein, es muß über das Bariumsalz gereinigt werden. Zur Bereitung dieses Salzes suspendiert man einen Teil rohen Methyloxychlorpurins in 40 Teilen heißen Wassers und fügt eine Lösung von einem Teil kristallisierten Barythydrat in 10 Teilen Wasser hinzu, kocht bis zur vollständigen Lösung und filtriert siedend heiß. Beim Abkühlen fällt das Bariumsalz in feinen schmalen Prismen aus. Nach mehrstündigem Stehen bei niederer Temperatur ist die Kristallisation ziemlich vollständig, so daß die Verarbeitung der Mutterlaugen sich nicht lohnt. Das Salz wird nochmals aus Wasser umkristallisiert. Zur Zersetzung wird das Salz in heißem Wasser (50 bis 60 Teile) gelöst und mit Essigsäure übersättigt. Beim Erkalten fällt die Substanz in weißen Nadeln aus.

1.7-Dimethyl-6-oxy-2-chlorpurin: 5 *g* Methyloxychlorpurin (über das Bariumsalz gereinigt) werden in 30 cm^3 Normalkalilauge gelöst und nach Zugabe von 5 *g* Jodmethyl im geschlossenen Rohr auf 80 bis 90° erwärmt. Sorgt man durch häufiges Umschütteln für die Mischung der Flüssigkeit, so beginnt schon nach zirka 25 Minuten die Abscheidung des Dimethyloxychlorpurins in feinen weißen Nadeln. Nach dreiviertelstündigem Erhitzen läßt man erkalten, filtriert und wäscht mit kaltem Wasser und wenig Alkohol. Ausbeute an 1.7-Dimethyl-6-oxy-2-chlorpurin 30% des angewandten Materials. Nebenher entsteht ein zweites Produkt, das in der Mutterlauge bleibt. Zur Reinigung wird das Dimethylchlorpurin aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 270°.

1.7-Dimethylxanthin (Paraxanthin): Das Dimethyloxychlorpurin wird mit der zehnfachen Menge rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·19 im geschlossenen Rohr 2½ Stunden im Ölbad auf 125 bis 130° erhitzt und dann die klare,

wenig gefärbte Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Das hiebei zurückbleibende Paraxanthin läßt sich am raschesten als Natriumsalz reinigen. Man löst es in ungefähr 15 Teilen heißen Wassers unter Zusatz von Natronlauge, fügt einen Überschuß des Alkalis hinzu und läßt erkalten. Das kristallisierte Salz wird in heißem Wasser gelöst, mit Essigsäure übersättigt und das nach dem Erkalten abgeschiedene Paraxanthin nochmals aus etwa 25 Teilen heißen Wassers umkristallisiert. Schmelzpunkt 295 bis 296°.

b) Synthese von Pyrimidinen.

Als Pyrimidin- oder Metadiazinring bezeichnet man einen Sechserring, der 4 Kohlenstoffatome und 2 Stickstoffatome enthält. Zur Unterscheidung der Pyrimidinderivate wurden die Kernkohlenstoffatome früher in folgender Weise bezeichnet:

```
  N — Cγ          N — C3
  |   |           |   |
μC    Cβ        μC    C2
  |   |           |   |
  N — Cα          N — C1
```

Jetzt numeriert man den Pyrimidinring auf Vorschlag *E. Fischers* in analoger Weise mit dem Purinring mit den Ziffern 1 bis 6.

```
1N — C6
 |    |
2C    C5
 |    |
3N — C4
```

Ebenso wie der Grundkörper der Purine, das Purin $C_5H_4N_4$, erst später als die substituierten Purine synthetisiert wurde, so führte auch bei den Pyrimidinen die Synthese zuerst zu den substituierten Pyrimidinen. Die Synthese des Grundkörpers der Pyrimidine $C_4H_4N_2$ ließ sich erst später durchführen. Der Grundkörper, das Pyrimidin, hat nur theoretische, aber keine physiologische Bedeutung. Es schmilzt sehr tief, ist bei 22° bereits flüssig und besitzt intensiv narkotischen Geruch.

Als Bausteine der Nukleinsäuren sind das Zytosin (2-Oxy-6-aminopyrimidin), das Urazil (2.6-Dioxypyrimidin) und das Thymin (5-Methyl-2.6-dioxypyrimidin) von physiologischem Interesse. Diese Körper wurden analytisch erstmals von *Kossel* und seinen Schülern durch mineralsaure Hydrolyse aus tierischen und pflanzlichen Nukleinsäuren dargestellt. Die Synthese des Urazils und des Thymins wurde zuerst von *E. Fischer* ausgeführt, das Zytosin synthetisch herzustellen, gelang erstmals *H. Wheeler* und *Treat B. Johnson.*

Synthese des Urazils, 2.6-Dioxypyrimidin[1]).

$$\begin{array}{cccccccccccc}
\mathrm{COOH} & & \mathrm{NH_2} & & \mathrm{NH} & \mathrm{CO} & & \mathrm{NH} & -\mathrm{CO} & & \mathrm{NH} & -\mathrm{CO} \\
| & & | & & | & | & & | & | & & | & | \\
\mathrm{CH} & + & \mathrm{CO} & = & \mathrm{OC} & \mathrm{CH_2} & \longrightarrow & \mathrm{CO} & \mathrm{CHBr} & \longrightarrow & \mathrm{OC} & \mathrm{CH} \\
\| & & | & & | & | & & | & | & & | & \| \\
\mathrm{CH_2} & & \mathrm{NH_2} & & \mathrm{NH} & -\mathrm{CH_2} & & \mathrm{NH} & -\mathrm{CH_2} & & \mathrm{NH} & -\mathrm{CH}
\end{array}$$

Akrylsäure Harnstoff Hydrourazil Bromdihydrourazil Urazil

5 *g* Akrylsäure werden mit 4·5 *g* Harnstoff eine Stunde auf 210 bis 220° erhitzt. Es entsteht meist eine homogene gelbe Flüssigkeit, welche gegen 200° so stürmisch Gas entwickelt, daß es nötig ist, das Gefäß zeitweise aus dem Bade zu entfernen, bis die Reaktion schwächer geworden ist. Das Produkt ist nach dem Erkalten eine feste, gelbe Masse. Die Schmelze wird in Wasser gelöst und auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft. Nach starkem Abkühlen wird filtriert und einmal aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle und ein zweites Mal aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute an Hydrourazil 1 *g*. Schmelzpunkt 275°. Erhitzt man 1 *g* Hydrourazil, welches in 4 *g* Eisessig gelöst ist, mit 1·4 *g* Brom im geschlossenen Rohr auf 100°, so ist das Halogen nach 1½ Stunden verschwunden und die Lösung hellgelb geworden. Beim Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser, Abkühlen und Reiben der Gefäßwandung beginnt bald die Kristallisation des Bromkörpers. Nach einer viertel Stunde sind 0·9 *g* reines, weißes Kristallisat abgeschieden. Aus der Mutterlauge wird beim Eindampfen noch 0·4 *g* eines schwach gefärbten Produktes erhalten. Erwärmt man 2 *g* Bromhydrourazil mit 20 *g* reinem Pyridin auf dem Wasserbade, so löst es sich rasch mit schwach gelber Farbe. Nach 5 Minuten trübt sich die Flüssigkeit und scheidet dann allmählich Kristalle ab, welche zum größten Teil aus bromwasserstoffsaurem Pyrimidin bestehen Nach 1½stündigem Erhitzen wird heiß filtriert. Die Lösung, welche das Urazil enthält, wird auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, mit Wasser befeuchtet und nochmals verdampft, um alles freie Pyridin zu entfernen. Der wenig gefärbte kristallinische Rückstand enthält noch brom-

[1]) *Fischer* und *Roeder*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 3751 (1901).

wasserstoffsaures Pyridin, welches man mit wenig eiskaltem Wasser auslaugt. Der zurückbleibende Teil wird in etwa 20 cm^3 heißem Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle gekocht und das Filtrat auf ein Drittel eingedampft. Beim Abkühlen auf 0° fällt das Urazil aus. Aus Wasser nochmals umkristallisiert, feine, mit kugeligen Aggregaten vereinigte Nädelchen. Ausbeute 0·47 *g* = 40% der Theorie. Die Substanz wird beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 280° braun und zersetzt sich unter Gasentwicklung bei 335°. Nach neueren Angaben[1]) gelingt es, das Urazil in besserer Ausbeute darzustellen, indem man einfach das Bromdihydrourazil bis zum Schmelzpunkt auf 195° erhitzt.

Synthese des Urazils nach *Wheeler* und *Meriam*[2]).

$$\begin{array}{ccccc} & NH_2 & C_2H_5O\,CO & & NH - CO \\ & | & | & & |\quad\quad | \\ CH_3.S - & C + & CH & \longrightarrow CH_3.S. & C\quad\quad CH \longrightarrow \\ & \| & \| & & \|\quad\quad \| \\ & NH & Na.O.CH & & N - \quad CH \end{array}$$

Methylpseudothioharnstoff — Natriumformylessigester — 2-Methylmerkaptourazil

$$\begin{array}{ccc} & HN - CO \\ & |\quad\quad | \\ \longrightarrow & OC\quad\quad CH \\ & |\quad\quad \| \\ & HN - CH \end{array}$$

Urazil.

Den für diese Reaktion nötigen Methylpseudothioharnstoff stellt man sich auf folgende Weise aus Ammoniumthiocyanat her. Ammoniumthiocyanat wird auf 170° 45 Minuten erhitzt und der entstandene Thioharnstoff zweimal aus Wasser unkristallisiert. Der Thioharnstoff wird fein gepulvert und ein Überschuß von Methyljodid zugegeben. Wegen der eintretenden Erwärmung setzt man einen Rückflußkühler auf. Nach zwölfstündigem Stehen gibt man Äther zu und filtriert vom Rückstand, wäscht mit Äther und trocknet. Das auf diese Weise hergestellte Rohprodukt kann für die Weiterverarbeitung benützt werden.

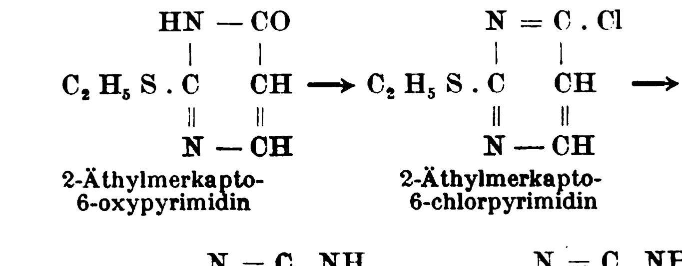
2-Methylmerkapto-6-oxypyrimidin: 7 *g* Ätzkali werden in 70 cm^3 Wasser gelöst. In diese 10%ige Natronlauge werden 38 *g* des Pseudomethylthioharnstoffjodids und 29 *g* Natronsalz des Formylessigesters zugegeben. Das nach den Vorschriften von

[1]) *Gabriel*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges.
[2]) *Wheeler* und *Meriam*: Amer. chem. Journ. **29**. 478 (1903).

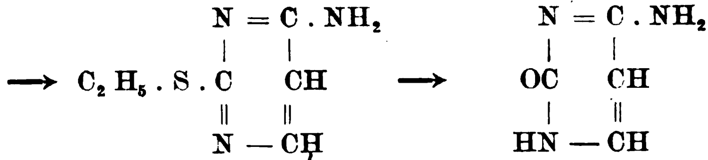
Wislicenus[1]) hergestellte Natronsalz des Formylessigesters enthält 70% des reinen Körpers. Nach mehrstündigem Stehen, etwa 12 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur, wird diese Mischung einige Minuten auf dem Wasserbad erwärmt und mit Essigsäure angesäuert. Der auf diese Weise entstehende kristallinische Niederschlag wird filtriert, gewaschen und getrocknet. Ausbeute 11·3 *g* (46%). Aus Wasser umkristallisiert, ist der Schmelzpunkt 198 bis 199°.

Urazil: 15 *g* des Methylmerkaptourazils werden in 150 cm^3 konzentrierter Salzsäure 4 Stunden gekocht, bis die Merkaptanentwicklung aufgehört hat. Die Lösung wird zur Trockne verdampft. Der Rückstand wiegt 11·9 *g* nach dem Trocknen. (94% Ausbeute). Das Rohprodukt schmilzt bereits bei 335°. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser schmilzt es bei raschem Erhitzen bei 338°.

Synthese des Zytosins nach *H. Wheeler* und *T. B. Johnson*[2]).



2-Äthylmerkapto-6-oxypyrimidin 2-Äthylmerkapto-6-chlorpyrimidin



2-Äthylmerzepto-6-aminopyrimidin 2-Oxy-6-aminopyrimidin (Zytosin)

2-Äthylmerkapto-6-oxypyrimidin: Thioharnstoff wird hergestellt durch dreiviertelstündiges Erhitzen von Thiocyanat auf 170° und Umkristallisieren des Rückstandes aus Wasser. Der Thioharnstoff wird fein gepulvert, in Alkohol aufgeschwemmt und ein Überschuß von Äthylbromid zugegeben. Nachdem man die Mischung 4 oder 5 Stunden gekocht hat, ist der größte Teil der Masse aufgelöst, es hinterbleibt nur ein unlöslicher Rückstand von Ammoniumbromid. Die Lösung wird filtriert und der größte Teil des Alkohols verdampft. Das auf diese Weise erhaltene Öl wird in einen Destillierkolben gebracht und das Äthylrhodanid unter vermindertem Druck auf dem Wasserbad abdestilliert. Der Rückstand verfestigt sich beim Abkühlen zu einer kristallinischen Masse,

[1]) *Wislicenus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **20.** 2933.
[2]) *A. Wheeler* und *T. B. Johnson*: Amer. chem. Journ. **29.** 492 (1903).

welche nach dem Trocknen auf Filtrierpapier bei 88° schmilzt. Für die weitere Verarbeitung ist das Pseudothioharnstoffhydrobromid rein genug. 50 *g* dieses Produktes werden in 10%iger Natronlauge gelöst und etwas mehr als die berechnete Menge trockenes Natriumsalz des Formylessigesters[1]) zugegeben. Nach drei- bis vierstündigem Stehen wird die Lösung zum Kochen erhitzt und nach dem Abkühlen mit Essigsäure angesäuert. Der entstandene kristallinische Niederschlag wird nach zwölfstündigem Stehen abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Ausbeute 48%. Aus Wasser umkristallisiert Schmelzpunkt 152°.

2-Äthylmerkapto-6-chlorpyrimidin: 6·3 *g* Äthylmerkapto-6-oxypyrimidin und 8·5 *g* Phosphorpentachlorid werden auf dem Wasserbad erwärmt. Sie reagieren unter Entwicklung von Salzsäure. Das Produkt ist ölig. Versuche, das Öl zu reinigen, führen meistens zur Zersetzung in Urazil. Das beigemengte Phosphoroxychlorid entfernt man durch Erhitzen in einem Ölbad auf 140° bei einem Druck von 12 *mm* ungefähr 15 Minuten lang. Das auf diese Weise erhaltene Öl wiegt 6·5 *g*.

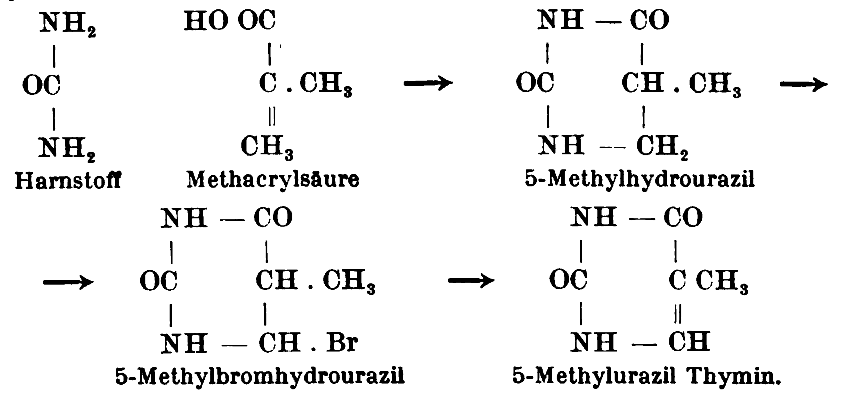
2-Äthylmerkapto-6-aminopyrimidin wird erhalten durch Erhitzen des entsprechenden Chlorpyrimidins mit alkoholischem Ammoniak in einer verschlossenen Druckröhre auf eine Temperatur von 140 bis 150° während 6 Stunden. Beim Öffnen der Röhre macht sich ein Geruch nach Merkaptan bemerkbar, Ammoniumchlorid hat sich abgesetzt. Vom Ammoniumchlorid wird abfiltriert, der Alkohol abgedunstet und der zurückbleibende dunkle Sirup mit einigen Kubikzentimetern kalten Wassers gewaschen. Bei dieser Behandlung erstarrt die Masse zu einem harten Kuchen. Gewicht des Rohproduktes 4·7 *g*. Die Base wird in verdünnter Salzsäure gelöst und mit Ammoniak wieder als kristallinischer Niederschlag gefällt. Aus 50%igem Alkohol unter Zugabe von Tierkohle umkristallisiert, kristallisiert die Base in farblosen Platten. Schmelzpunkt 85 bis 86°.

Zytosin: 3 *g* des 2-Äthylmerkapto-6-aminopyrimidins werden 2 Stunden mit 15 cm^3 Bromwasserstoffsäure auf 125° erhitzt, bis die Merkaptanentwicklung aufhört. Nach dem Verdampfen der Bromwasserstoffsäure auf dem Wasserbad wird das bromwasserstoffsaure Salz des Zytosins als schön kristallisierte Masse erhalten. Die freie Base erhält man durch Auflösen dieses Salzes in Wasser und Füllen mit Ammoniak. Ausbeute 1·9 *g*. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser mit Tierkohle kristallisiert das Zytosin in prismatischen Nadeln. Es zersetzt sich bei 320 bis 325°.

---

[1]) *Wislicenus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **20**. 2933 (1887).

Synthese des Thymins nach *E. Fischer* und *G. Roeder*[1]).



Die Darstellung des 5-Methylhydrourazils geschieht in der nämlichen Weise wie sie für das Hydrourazil bei der Synthese des Urazils angegeben wurde. Ein kleiner Unterschied zeigt sich nur darin, daß während der Schmelze ein reichliches Sublimat von Ammoniumkarbonat entsteht. Das Produkt wird aus siedendem Alkohol, dann aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Schmelzpunkt 264 bis 265°.

5-Methylbromhydrourazil: 4 *g* Hydrothymin werden in 16 *g* Eisessig gelöst, 5·6 *g* Brom zugegeben und im geschlossenen Rohr 2 Stunden auf 100° erhitzt. Das Brom war dann fast verschwunden; die Lösung schied aber erst Kristalle ab, nachdem sie mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt und gekühlt war. Die Menge des ausgefällten Bromkörpers beträgt 4 *g*. Aus der Mutterlauge entsteht beim Verdampfen und Anrühren mit Wasser noch 1 *g*. Beim Umkristallisieren verliert der Körper bereits Brom. Zur Weiterverarbeitung wird deshalb das Rohprodukt benützt.

Thymin: Die Behandlung des 5-Methylbromhydrourazils mit Pyridin wird ebenso ausgeführt, wie dies bereits bei der Darstellung des Urazils aus dem Bromhydrourazil beschrieben wurde. Bei Anwendung von 25 *g* Methakrylsäure beträgt die Ausbeute an Thymin 4 *g* oder 10% der Theorie. Es zersetzt sich zwischen 318 bis 321°.

Synthese des Thymins nach *Wheeler* und *Merriam*[2]).

$$\begin{array}{ccc} & NH_2 & & C_2H_5O.CO & \\ & | & & | & \\ CH_3.S.C & & & C.CH_3 & \longrightarrow \\ & \| & & \| & \\ & NH & & Na\,O\,CH & \end{array}$$

Methylpseudothioharnstoff — Natriumformylpropionsäureester

1) *E. Fischer* und *G. Roeder*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 3758 (1901).
2) *Wheeler* und *Merriam*: Amer. chem. Journ. **29**. 478 (1903.)

```
              NH — CO                          NH — CO
               |    |                           |    |
→   CH3 . S . C    C . CH3        →            OC    C . CH3
              ||   ||                           |    ||
              N———CH                           NH — CH
```

2-Methylmerkapto-5-methyl-6-oxypyrimidin (Thymin)-5-Methylurazil.

2-Methylmerkapto-5-methyl-6-oxypyrimidin: 6·5 *g* des bei der Darstellung des Urazils beschriebenen Additionsproduktes von Methyljodid und Thioharnstoff werden mit einer Lösung von 17 *g* Ätzkali in 150 cm^3 Wasser behandelt und 45 *g* Natriumsalz des Formylpropionsäureesters zugegeben. Nach zweieinhalbtägigem Stehen wird die Mischung von etwas Sediment abfiltriert und mit Essigsäure neutralisiert. Es setzt sich ein feiner Niederschlag von Methylmerkaptothymin ab. (9·2 *g*; 20% der Theorie.) Aus Wasser umkristallisiert, ist der Schmelzpunkt bei 225 bis 233°.

(5-Methylurazil) Thymin: 9·2 *g* des Merkaptothymins werden mit 100 cm^3 konzentrierter Salzsäure 10 Stunden gekocht, bis kein Merkaptan sich mehr entwickelt. Nach dem Abdunsten der Salzsäure hinterbleibt 7·3 *g* rohes Thymin (99% der Theorie). Aus Wasser umkristallisiert, kristallisiert das so erhaltene Thymin in schmalen, rechtwinkeligen und farblosen Platten. Schmelzpunkt 326°.

c) Synthese von Ureiden.

Synthese der Parabansäure (Oxalylharnstoff)[1]).

```
                    NH2
CO OC2 H5            |                              CO — N . Na
 |               + CO   + Na OC2 H5   →              |       >CO
CO OC2 H5            |                              CO — NH
                    NH2
```

Oxalsäureester Harnstoff Natriumsalz der Parabansäure.

Harnstoff in einer absolut alkoholischen Lösung von Natriumäthylat wird mit der äquivalenten Menge Oxalsäureester versetzt. Es scheidet sich bereits beim Zusatz des ersten Tropfens Oxalsäureesters ein weißer, kristallinischer Niederschlag aus, welcher das Natriumsalz der Parabansäure ist. Das Natriumsalz entsteht in nahezu quantitativer Ausbeute. Versetzt man die wässerige Lösung des Natriumsalzes mit verdünnter Salzsäure, so erhält man die Parabansäure.

---

[1]) *Michael*: Journ. f. prakt. Chem. **35**. 5. 457 (1887).

Darstellung der Oxalursäure aus Parabansäure[2]).

$$\begin{array}{l} CO - NH \\ | \qquad > CO \\ CO - NH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CO - NH \\ | \qquad\quad | \\ COOH \; CO \\ \qquad\quad\;\; | \\ \qquad\quad NH_2 \end{array}$$

Parabansäure — Oxalursäure

Parabansäure wird in der Kälte in Ammoniak gelöst und dann zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten erstarrt die Lösung zu einem kristallinischen, weißen Brei. Dies ist das Ammoniaksalz der Oxalursäure. Die konzentrierte, warme Auflösung des Ammoniaksalzes in Wasser wird mineralsauer gemacht und abgekühlt. Die freie Oxalursäure scheidet sich dann als lockeres, weißes Kristallpulver ab.

Synthese des Hydantoins[2]).

$$OC\!<\!\begin{array}{l} NH - CO \\ \qquad\quad\;\; | \\ NH_2 \;\; CH_2Br \end{array} \longrightarrow OC\!<\!\begin{array}{l} NH - CO \\ \qquad\quad | \\ NH - CH_2 \end{array}$$

Bromacetylharnstoff — Hydantoin

Bromacetylharnstoff wird in Portionen von 5 *g* mit überschüssigem alkoholischen Ammoniak in verschlossenem Gefäß (birnförmige Sodawasserflasche) 6 Stunden im Wasserbade erhitzt. Der Harnstoff geht dabei vollständig in Lösung. Die gelbliche Flüssigkeit gibt beim Eindampfen eine feste Masse, die beim Ausziehen mit kaltem Wasser Hydantoin hinterläßt. Das Rohprodukt wird mit Tierkohle aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 216°.

Substituierte Hydantoine werden nach *Moncyrat*[3]) durch Kondensation von α-Aminosäuren mit Phenylcyanat und durch Kochen der so entstandenen substituierten Hydantoinsäuren mit 25%iger Salzsäure erhalten.

Synthese des Allantoins[4]).

$$OC\!<\!\begin{array}{l} NH - CO \\ \qquad\quad | \\ NH - CH_2 \end{array} + Br + \begin{array}{l} NH_2 \\ > CO \\ NH_2 \end{array} \longrightarrow OC\!<\!\begin{array}{l} NH - COH - NH \\ \qquad\quad | \qquad\qquad > CO \\ NH - CH \;\; - \;\; NH \end{array}$$

Hydantoin — Allantoin

---

[1]) *Wöhler* und *Liebig*: Ann. **26**. 5. 287 (1838).
[2]) *A. Baeyer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **8**. 613 (1875).
[3]) *A. Moncyrat*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 2393 (1900).
[4]) *Siemonsen*: Ann. **333**. 135 (1904).

4 *g* Hydantoin, 6·4 *g* Brom und 0·2 *g* Harnstoff und 25 cm^3 Eisessig werden am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt und innerhalb 10 Minuten 3 *g* Harnstoff in 20 cm^3 Eisessig gelöst, heiß in Portionen zugegeben und noch einige Minuten gekocht. Es ist dann noch nicht alles Brom verbraucht. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft und der erhaltene Sirup mit Alkohol, Äther und etwas Wasser versetzt. Nach eintägigem Stehen wird abfiltriert und der feinverriebene Rückstand zweimal mit 95%igem Alkohol ausgekocht. Das unveränderte Hydantoin geht in Lösung und der Rückstand besteht aus Allantoin. Das aus der Lösung durch Abdestillieren des Alkohols erhaltene Hydantoin wird ohne weitere Reinigung wieder auf Allantoin verarbeitet. Nach längerem Stehen kristallisiert aus der Mutterlauge, die nach dem Abfiltrieren des Gemisches von Hydantoin und Allantoin erhalten wird, etwas Hydantoin und Bromammonium in reichlicher Menge aus. Die Ausbeuten sind sehr wechselnd; in günstigstem Fall beträgt sie 25% der Theorie, auf Hydantoin berechnet. Schmelzpunkt 230 bis 232°.

Darstellung des Allantoins aus Harnsäure[1]).

Da die Ausbeuten der oben beschriebenen Synthese des Allantoins sehr schlechte sind, geht man zur präparativen Darstellung des Allantoins besser von der leicht zugänglichen Harnsäure aus.

100 *g* Harnsäure werden in 2 *l* Wasser aufgeschwemmt, durch Natriumhydratlösung in Lösung gebracht und mit einer kalten, konzentrierten Lösung von 62 *g* Kaliumpermanganat unter Umschütteln versetzt. Es entfärbt sich die Oxydationsmischung sehr bald, höchstens nach etwa einer Stunde. Wird diese Mischung mit Essigsäure nach raschem Filtrieren angesäuert und zur Kristallisation eingedampft, so erhält man fast die theoretische Menge Allantoin. Man soll nach *Claus*[2]) die filtrierte Oxydationsmischung bald ansäuern, da anderenfalls Verluste an Allantoin durch Oxalsäurebildung entstehen.

Darstellung des Alloxans aus Harnsäure[3]).

Man mischt einen Teil Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·42) mit 8 bis 10 Teilen Wasser von 60 bis 70° und fügt in die warme Säure allmählich Harnsäure ein. Man wartet mit jedem neuen Zusatz, bis die eingetragene Harnsäure sich aufgelöst hat. Die mit Harnsäure gesättigte Salpetersäure wird zum Kochen erhitzt und filtriert. Zum Filtrat setzt man nach und nach eine konzentrierte, mit dem gleichen Volumen roher Salzsäure versetzte Zinnchlorür-

[1]) *E. Sundvick*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**. 343 (1904).
[2]) *Claus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **7**. 227.
[3]) *Liebig* und *Wöhler*: Ann. **26**. 256.

lösung, solange noch Alloxantin gefällt wird, hinzu. Färbt sich die Flüssigkeit auf Zusatz von Sn Cl_2 gelb, so ist der Fällungspunkt überschritten. Das gefällte Alloxantin wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und auf Tonteller getrocknet. Sind die Filtrate vom Alloxantin trübe, so setzt man dem Waschwasser etwas Salzsäure zu. Man rührt das Alloxanthin dann mit einem Gemisch von 2 Teilen Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·50) und einen Teil Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1·42) zum Brei an und läßt diesen so lange stehen, bis er sich leicht und völlig in Wasser löst. Der Brei von Alloxan wird dann auf Ton getrocknet, das Alloxan hierauf in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade so lange erhitzt, bis alle Salpetersäure entwichen ist, und aus wenig Wasser umkristallisiert.

Synthesen von Nukleosiden

und einfachen Nukleotiden.

Von **Thannhauser,** München.

Der synthetische Aufbau von Purinzuckerverbindungen ist *Emil Fischer* durch die Einwirkung von Acetobromglukose auf die Silbersalze der Purine und Pyrimidine gelungen. Die entstehenden Acetylverbindungen lassen sich mehr oder weniger leicht durch alkoholisches Ammoniak in die freien Glukoside verwandeln. Die Reaktion verläuft nach dem allgemeinen Schema

$$C_7H_7O_2N_4Ag + Br\,C_6H_7O_5 = C_7H_7O_2N_4 . C_6H_7O_5\,(C_2H_3O)_4 + Ag\,Br$$

Theophyllin-silber	+	Acetobrom-glykose	=	Theophyllintetraacetylglukosid	Brom-silber.

Das Wesentliche der Reaktion ist, daß sie sich nur bei sehr hoher Temperatur in absolut wasserfreien Medien vollzieht. *Emil Fischer* hat daher eine Methode ausgearbeitet, bei der die Purin-silbersalzc und die Acetobromglukose in kochendem Xylol zur gegenseitigen Reaktion gebracht werden. Zur Bereitung der entsprechenden Glykoside des Guanins und Adenins geht *Emil Fischer* nicht von den Silbersalzen dieser Purine aus, da die Bildung verschiedener Isomere die Isolierung eines einheitlichen Reaktionsproduktes erschwert. Er macht deshalb zur Synthese des Guanin- und Adeninglukosids den Umweg über die Silbersalze der gechlorten Purine, die einheitlichere Reaktionsprodukte liefern.

Während beim Theophyllin und auch beim Adenin und Guanin die Glykosidbindung nur im Imidazolkern entweder in Stellung 7 oder 9 erfolgen kann, dürfte beim Theobromin der Zuckerrest an den Pyrimidinkern treten, und zwar kann er hier sowohl in Stellung 1 an Stickstoff als auch an Sauerstoff in Stellung 2 bezw. 6 fixiert sein.

Zwischen den einzelnen Isomeren zu entscheiden, ist bisher nicht gelungen. Beim Theophyllin ist es wahrscheinlich, daß die Kuppelung in Stellung 7 eintritt, denn die Methylierung des Theophyllins über das Silbersalz führt zum Kaffein, d. h. zum Eintritt des Methyls in 7-Stellung. Beim Theobrominglukosid, das schon beim Kochen mit verdünntem Alkali in seine Komponenten zerfällt, würde diese größere Hydrolysierbarkeit für den Eintritt der Glukosid-

bindung in Stellung 1 sprechen, da dann die Nachbarschaft zweier CO-Gruppen die leichte Spaltbarkeit erklären würde. Ein eventuelles Glukosid der Harnsäure würde demnach auch außerordentlich leicht in seine Komponenten zerfallen, da mindestens eine CO-Gruppe in der Nachbarschaft der Glukosidbindung wäre.

Viel schwieriger als die Gewinnung der Puringlukoside haben sich die Versuche *E. Fischers* zur Synthese der Pyrimidinglukoside des Zytosins und Urazils gestaltet. *E. Fischer* konnte mit seiner Methode bisher kristallisierte Glukoside nur vom Thiourazil erhalten. Die entsprechenden Glukoside des Urazils und Zytosins kristallisieren nicht und erleiden außerordentlich leicht unter Rückbildung der Pyrimidine eine tiefergehende Zersetzung.

Thannhauser und *Dorfmüller* brachten 4.5-Diaminopyrimidine mit Zuckern in Reaktion und wollten analog der *Traube*schen Purinsynthese zu Puringlukosiden gelangen. Die Schließung des Puringes gelang bisher nicht. Es entstanden nur Glukoside der Aminopyrimidine.

Nachdem es *E. Fischer* gelungen war, Puringlukoside synthetisch darzustellen, versuchte er, auch die Phosphorsäure an den Zucker des Puringlukosids heranzubringen und so in der Natur die vorgebildeten Nukleotide synthetisch aufzubauen. Er ließ Phosphoroxychlorid und Pyridin auf das Theophyllinglukosid einwirken und isolierte aus dem Reaktionsgemisch einen kristallisierten Körper, der sich als die Theophyllinglukosidphosphorsäure erwies. Die Theophyllinglukosidphosphorsäure ist das erste kristallisierte, synthetische Produkt aus der Gruppe der Nukleotide.

Synthese des Theophyllin-d-glukosids[1]).

```
CH3 . N — CO                                CH3 . N — CO
      |    |                                      |    |
      CO   C — N  C6H11O5     oder                CO   C — N
      |    ||     >CH                             |    ||     >CH
 CH3 N  —  C — N                            CH3 . N — C — N — C6H11O5
```

D a r s t e l l u n g d e s T e t r a a c e t y l t h e o p h y l l i n - d - g l u k o s i d s: 50 *g* bei 130° getrocknetes Theophyllinsilber werden mit einer Lösung von 70 *g* Acetobromglukose in 500 cm^3 trockenem Xylol eine Minute gekocht. Dabei verschwindet das weiße Silbersalz, und an seine Stelle tritt ein gelber Niederschlag von Bromsilber. Die Flüssigkeit wird heiß abgesaugt, mit 500 cm^3 Xylol verdünnt und mit 2 *l* Petroläther versetzt. Dabei fällt ein weißer, amorpher Niederschlag, aus der rasch fest wird und sich gut absaugen läßt. Er

[1]) *E. Fischer* und *B. Helferich*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 210 (1914).

wird mit Petroläther gewaschen und in 800 *cm*³ absolutem Alkohol heiß gelöst. Beim langsamen Abkühlen kristallisiert das Tetraacetyltheophyllinglukosid in schräg abgeschnittenen, langen, flachen Prismen. Ausbeute 65 *g* oder 75% der Theorie. Zur weiteren Verarbeitung auf freies Glukosid ist der Körper genügend rein. Aus Wasser umkristallisiert Schmelzpunkt 168 bis 170°. Aus Alkohol umkristallisiert Schmelzpunkt 147 bis 149°. (Dimorphie ?)

Theophyllin-d-glukosid: 10 *g* des Acetylkörpers werden in 200 *cm*³ warmem, trockenem Methylalkohol gelöst und die Lösung unter Eiskühlung mit gasförmigem Ammoniak gesättigt. Ein anfänglich dabei entstehender Niederschlag löst sich dabei wieder auf. Nach 15stündigem Aufbewahren m Eisschrank hatte sich eine filzartige Masse in sternförmig angeordneten Nadeln abgeschieden, die eine Ammoniakverbindung des Glukosids ist. Sie löst sich leicht in Wasser und ammoniakfreiem Methylalkohol.

Aus der alkoholischen Lösung kristallisiert das freie Glukosid nach einigem Stehen aus. Am besten saugt man daher die Ammoniakverbindung ab, löst sie auf der Nutsche mit trockenem Methylalkohol und befreit die vereinigten Filtrate von der Hauptmenge des Ammoniaks durch Eindampfen unter vermindertem Druck, bis die Kristallisation des Glukosids beginnt. Nach 20stündigem Aufbewahren bei 0° ist die Ausbeute an Glukosid nahezu quantitativ 6·2 *g*. Sandiges Kristallpulver, das aus sehr regelmäßig ausgebildeten, rhombisch begrenzten Plättchen besteht. Schmelzpunkt 278 bis 280° (wasserfrei). Aus Wasser kristallisiert es mit 2 Molekülen Kristallwasser. Das wasserfreie Glukosid ist in Methylalkohol, Äthylalkohol und Aceton schwer löslich, unlöslich in Chloroform und Äther. *Fehling*sche Lösung wird nicht reduziert. Alkali spaltet bereits bei Zimmertemperatur das Glukosid. Durch Salzsäure wird das Glukosid in Theophyllin und Traubenzucker zerlegt. Emulsin spaltet es nicht. $[\alpha]_D^{20} = -2{\cdot}33^\circ$ (in Wasser).

Darstellung des Theobromin-d-glukosids[1]).

```
C6H11O5 . N — CO                 HN — CO . C6H11O5
          |     |                  |     ||
         CO     C — N . CH3  oder  CO    C — N . CH3  oder
          |     ||     >CH         |     ||     >CH
    CH3 . N  —  C — N            CH3N    C — N

                     N — CO
                     ||   |
       C6H11O5 . O . C    C — N . CH3
                     |    ||     >CH
               CH3 . N  — C — N
```

[1]) *E. Fischer* und *B. Helferich*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 210 (1914).

Darstellung des Tetraacetyltheobromin-d-glukosids: 5 *g* bei 130° getrocknetes Theobrominsilber werden mit einer Lösung von 7·1 *g* Acetobromglukose in 100 cm^3 trockenem Toluol eine halbe Stunde gekocht, von dem Bromsilber heiß abgesaugt und das Filtrat mit 200 cm^3 Petroläther versetzt. Dabei fällt ein amorpher, klebriger Niederschlag aus, der sich rasch am Glas festsetzt. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und der Niederschlag mit 50 cm^3 kaltem, trockenem Methylalkohol verrieben. Dabei geht er in Lösung, und sofort beginnt die Abscheidung von farblosen Nadeln, die nach Abkühlen auf 0° abgesaugt werden. Ausbeute 2 *g* (23% der Theorie). Zur völligen Reinigung werden sie in 50 cm^3 warmem Essigester gelöst, nach dem Klären mit Tierkohle durch 60 cm^3 Petroläther wieder abgeschieden. Der Schmelzpunkt ist unscharf. Gegen 180° beginnt es zu einem dicken, undurchsichtigen Sirup zu sintern. Beim weiteren Erhitzen bräunt es sich mehr und mehr und zersetzt sich gegen 270° völlig. Es löst sich in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht. Bei sehr raschem Abkühlen kristallisiert ein Teil unverändert wieder aus. Dauert die Operation länger, so wird der größte Teil zersetzt und Theobromin fällt aus. Ähnlich wird es durch heißen Äthyl- und Methylalkohol gespalten. In Azeton und Chloroform ist es sehr leicht löslich, schwer in Benzol und Essigsäure. Beim Kochen reduziert es *Fehling*sche Lösung.

Darstellung des Theobromin-d-glukosids: Wegen der Unbeständigkeit der Glukosidbindung muß die Abspaltung der Acetylgruppen mit besonderer Vorsicht ausgeführt werden. 120 cm^3 trockener Methylalkohol werden mit Ammoniak unter Abschluß von Feuchtigkeit bei 0° gesättigt. Man fügt nun weitere 150 cm^3 trockenen Methylalkohol und 3 *g* Tetraacetyltheobrominglukosid zu und schüttelt bei Zimmertemperatur, bis nach etwa 20 Minuten klare Lösung eingetreten ist. Nachdem die Flüssigkeit jetzt 3 Stunden bei 0° aufbewahrt ist, wird sie bei 20° unter geringem Druck möglichst rasch zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 12 cm^3 kaltem Wasser aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle geklärt und unter Rühren nach und nach mit 120 cm^3 Aceton versetzt. Bald beginnt die Abscheidung von schmalen, langen Prismen, die vielfach sternförmig vereinigt sind. Ausbeute 0·7 *g*. Aus der Mutterlauge beim Aufbewahren in Eis noch 0·3 *g*. Zur Reinigung wird es in 10 Teilen Wasser gelöst und mit 100 Teilen Aceton wieder abgeschieden; enthält, so hergestellt, 1 Molekül Kristallwasser. Gegen 205° beginnt es zu sintern, unter Braunfärbung Bei weiterem Erhitzen verkohlt es unter Braunfärbung, ohne zu schmelzen. Kein Unterschied zwischen wasserhaltigem und getrocknetem Präparat. Das Glukosid ist in kaltem Wasser mäßig leicht löslich, etwas schwerer in Methylalkohol, ziemlich schwer

in Alkohol, sehr schwer in Azeton und Äther, unlöslich in Benzol. Beim Kochen mit Wasser wird es bereits in seine Komponenten gespalten, daher reduziert es stark *Fehling*sche Lösung. $[\alpha]\,D_{20}^{D} = -49{\cdot}58^{0}$ (in Wasser 10 Minuten nach Auflösung), $[\alpha]\,D_{20}^{D} = -48{\cdot}25^{0}$ (in Wasser 20 Minuten nach dem Auflösen).

Darstellung des Adenin-d-glukosids[1]).

$$\begin{array}{lll}
 & N = C\,.\,NH_2 & \\
 & \;|\qquad | & \\
Cl\,C & \quad C - N\,.\,Ag & + \; Br\,C_6H_7O_5(C_2H_3O)_4 \longrightarrow \\
 & \;\|\qquad \| \quad \geqslant C\,.\,Cl & \\
 & N - C - N &
\end{array}$$

2.8-Dichlor-6-Aminopurinsilber + Acetobromglukose

$$\begin{array}{lll}
 & N = C\,.\,NH_2 & \\
 & \;|\qquad | & \\
\longrightarrow \; Cl\,C & \quad C - N\,.\,C_6H_7O_5(C_2H_3O)_4 & \longrightarrow \\
 & \;\|\qquad \| \quad \geqslant C\,.\,Cl & \\
 & N - C - N &
\end{array}$$

Tetraacetyldichloradenin-d-glukosid

$$\begin{array}{llll}
 & N = C\,.\,NH_2 & & N = C\,.\,NH_2 \\
 & \;|\qquad | & & \;|\qquad | \\
\longrightarrow Cl\,C & \quad C - N\,.\,C_6H_7O_5(C_2H_3O)_4 \longrightarrow & HC & \quad C - N\,.\,C_6H_{11}O_5 \\
 & \;\|\qquad \| \quad \geqslant C\,Cl & & \;\|\qquad \| \quad \geqslant CH \\
 & N - C - N & & N - C - N
\end{array}$$

Dichloradenin-d-glukosid — Adenin-d-glukosid.

Tetraacetyldichloradenin-d-glukosid: 36 *g* fein gepulvertes, wasserfreies 2.8-Dichlor-6-aminopurinsilber[2]) werden mit einer Lösung von 47 *g* Acetobromglukose in 500 cm^3 trockenem Xylol 6 Stunden im Ölbad gekocht und die bräunliche Flüssigkeit heiß abgesaugt. Beim Abkühlen fällt der Acetylkörper als amorpher Niederschlag. Man vervollständigt die Fällung durch Zugabe des doppelten Volumens Petroläther und saugt den pulverigen Niederschlag ab. Beim Verreiben mit etwa dem gleichen Gewicht Eisessig verwandelt er sich in feine Prismen. Sie wurden durch Pressen von der Mutterlauge befreit, in 120 cm^3 reinem Aceton gelöst und mit 1·5 *l* kochendem Wasser versetzt. Dabei kristallisieren noch schwach gelbe, gebogene Nädelchen, die aber zur Weiterverarbeitung rein genug sind. Ausbeute 17 *g* (29% der Theorie). Zur Reinigung Um-

---

[1]) *E. Fischer* und *B. Helferich*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 231 (1914).

[2]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 2240 (1897). Beschreibung der Synthese, vgl. S. 132 (voriges Kapitel).

kristallisieren aus der vierfachen Menge Eisessig, dann noch aus Azeton und Fällen mit kochendem Wasser. Schmelzpunkt 213 bis 215°. Reduziert *Fehling*sche Lösung nicht.

Dichloradenin-d-glukosid: 15·5 *g* Acetylkörper werden in 500 cm^3 trockenem Methylalkohol in der Hitze gelöst und in Eis abgekühlt. Wenn eben die Kristallisation beginnt, fügt man das gleiche Volumen einer bei 0° gesättigten Lösung von Ammoniak in Methylalkohol zu und hält die Mischung 3 Stunden bei 0°. Dann werden Methylalkohol und Ammoniak unter vermindertem Druck zunächst bei Zimmertemperatur, zum Schluß etwa bei 30° abgedampft und der sirupöse Rückstand mit 150 cm^3 heißem Wasser übergossen. Sofort beginnt die Abscheidung des freien Glukosids in feinen Nädelchen. Man kühlt noch einige Zeit in Eis, saugt ab und wäscht mit wenig kaltem Wasser. Ausbeute 9 *g* (85% der Theorie). Zur weiteren Reinigung kann man es aus 25 Teilen heißen Wassers, dann nochmals durch Lösen in viel heißem Alkohol und Fällen mit dem vierfachen Volumen Äther umkristallisieren. Schmelzpunkt 250° unter Zersetzung. In Wasser in der Hitze löslich (in der Kälte in 250 Teilen). In den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln ist es sehr schwer bis unlöslich. *Fehling*sche Lösung wird nicht reduziert.

Adenin-d-glukosid: 4·5 *g* Dichloradeninglukosid werden in 45 cm^3 Jodwasserstoffsäure (1·96), die auf —15° abgekühlt ist, eingetragen und nach Zusatz von 5 *g* gepulvertem Jodphosphonium kräftig umgeschüttelt, wobei sofort starke Braunfärbung eintritt. Das Schütteln wird dann bei 0° nach 2 Stunden fortgesetzt. Zum Schluß ist die Flüssigkeit nur noch schwach gelb gefärbt. Man gießt sie in 200 cm^3 Eiswasser und fügt sofort eine eiskalte Lösung von Bleiazetat in 800 cm^3 Wasser zu. Nach einiger Zeit saugt vom Jodblei ab, wäscht mit Wasser und schüttelt die vereinigten Filtrate mit Silberazetat bis zur völligen Entfernung des Jodwasserstoffes. Man filtriert die Lösung durch ein mit Tierkohle gedichtetes Filter, befreit das klare Filtrat mit Schwefelwasserstoff von Silber und Blei und verdampft bei vermindertem Druck bei einer Badtemperatur von 30 bis 40° zur Trockne. Der Rückstand wird in 35 cm^3 Wasser gelöst und dann nach und nach mit 600 cm^3 Azeton versetzt. Dabei fällt das Adeninglukosid in körniger, teilweise mikrokristallinischer Form. Ausbeute 3·5 *g*. Da dieses Produkt noch Asche enthält, welche durch Umkristallisieren nicht wegzubringen ist, wird es über das Pikrat gereinigt.

2 *g* rohes Glukosid, in 20 cm^3 warmem Wasser gelöst, wird mit einer heißen Lösung von 1·55 *g* Pikrinsäure in 50 cm^3 Wasser versetzt. Beim Abkühlen kristallisiert das Pikrat in länglichen, trapezförmigen Tafeln (2·8 *g*). Es wird aus 100 cm^3 heißem Wasser umkristallisiert, abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen

(2·5 *g*). Schmelzpunkt 240 bis 250°. Zur Gewinnung des freien Glukosids wurden 2·5 *g* des Pikrates fein gepulvert in 70 *cm*³ n/2-Salzsäure suspendiert und mehrfach mit Äther ausgeschüttelt, bis fast völlige Lösung eingetreten war. Man filtriert von einem geringen Rückstand ab und äthert die wässerige Lösung noch einige Male bis zur völligen Entfärbung aus. Dann wird auf 300 *cm*³ verdünnt, mit 15 *cm*³ Essigsäure von 50% angesäuert und etwa auf 60° erwärmt, hierauf mit überschüssigem Silberazetat bis zur Entfernung der Salzsäure geschüttelt und warm vom Niederschlag abgesaugt. Nachdem das Silber durch Schwefelwasserstoff entfernt ist, wird unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in 15 *cm*³ Wasser gelöst und durch allmählichen Zusatz von 300 *cm*³ Azeton gefällt. Ausbeute 1 *g*. Aus 3 *cm*³ heißem Wasser kristallisiert das reine Adenin-d-glukosid in langen, flachen, schräg abgeschnittenen Prismen (0·8 *g*). Es enthält noch etwas Kristallwasser und wird bei 110° im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Beim Erhitzen im Kapillarrohr zeigt es ein charakteristisches Verhalten. Bei sehr raschem Erhitzen sintert es und schmilzt gegen 210° unter Gasentwicklung zu einem farblosen Sirup, aus dem sich nach wenigen Sekunden schöne Kristalle abscheiden. Bei weiterem Erhitzen bräunt sich die Masse gegen 240° und schmilzt vollständig unter Gasentwicklung und Bräunung bei 275°. Adenin-d-glukosid ist in kaltem Wasser mäßig leicht löslich, in heißem Wasser sehr leicht, in heißem Eisessig leicht in allen anderen organischen Lösungsmitteln schwer löslich. Mit einer möglichst neutralen, ammoniakalischen Lösung von Silbernitrat gibt das Glukosid ein Silbersalz, das in überschüssigem Ammoniak löslich ist und beim Wegkochen oder Verdunsten des Ammoniaks zum Teil in Nädelchen kristallisiert. Die etwa 3·5%ige Lösung des Glukosids gibt mit einer konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung einen amorphen Niederschlag, der beim Erwärmen sich löst und beim Erkalten in flachen Prismen wieder auskristallisiert. *Fehling*sche Lösung reduziert das Glukosid nicht $[\alpha]_D^{20} = -10{\cdot}50°$ (in wässeriger Lösung).

Darstellung des Hypoxanthin-d-glukosids aus Adenin-d-glukosid: Die Wirkung der salpetrigen Säure auf das Adeninglukosid geht bei gewöhnlicher Temperatur langsam vonstatten. Es ist deshalb nötig, die Säure in großem Überschuß anzuwenden. 3·5 *g* rohes aschehaltiges Adeninglukosid werden in 15 *cm*³ Wasser gelöst, eine Lösung von 7 *g* Natriumnitrit in 15 *cm*³ Wasser und dann 8 *cm*³ Eisessig zugegeben und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Aus der Lösung entwickelte sich langsam Stickstoff. Nach 8 Stunden erfolgt nochmals die Zugabe von 3·5 *g* Natriumnitrit und 4 *cm*³ Eisessig. Nach weiteren 12 Stunden wird die Flüssigkeit zunächst bei Zimmertemperatur, dann bei 40° Badtemperatur zur Trockne verdampft. Zur Isolierung

des Hypoxanthinglukosids dient die Bleiverbindung. Der Rückstand wird in 60 cm^3 Wasser gelöst, eine Lösung von 10 *g* Bleiazetat in 30 cm^3 Wasser zugegeben und unter Umrühren mit konzentriertem Ammoniak tropfenweise versetzt, bis die Flüssigkeit deutlich danach riecht. Dabei fällt eine amorphe, weiße Masse. Nach dem Absaugen wird sie mit Wasser gewaschen, abgepreßt und in 95 cm^3 Wasser und 5 cm^3 50%iger Essigsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wird unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand in 10 cm^3 warmem Wasser gelöst und filtriert. Beim Erkalten scheidet sich das Hypoxanthinglukosid langsam in langen Nädelchen aus. Ausbeute 1·5 *g*. Die Kristalle enthalten noch 1 Molekül Kristallwasser, das bei 110° im Vakuum über Phosphorpentoxyd rasch entweicht. Schmelzpunkt 245° unter Zersetzung und Bräunung. In heißem Wasser sehr leicht löslich, schwerer in Eisessig und Alkohol, nahezu unlöslich in anderen organischen Lösungsmitteln. Eine etwa 6%ige Lösung des Glukosids in Wasser gibt mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure eine starke amorphe Fällung. Diese löst sich in der heißen Mischung in erheblicher Menge, fällt beim Erkalten zunächst wieder amorph aus, wird aber bei längerem Aufbewahren wieder kristallinisch. Ammoniakalische Silbernitratlösung fällt aus der Lösung des Glukosids ein amorphes Silbersalz, das sich im Überschuß von Ammoniak löst. Beim Wegkochen des Ammoniaks fällt es wieder amorph aus, kristallisiert aber dann allmählich zu in Sternen vereinigten Nädelchen. $[\alpha]_D^{20} = -34{\cdot}50$ (in n. Natronlauge gelöst).

Darstellung des Guanin-d-glukosids[1]).

```
    N = C . NH2                              N = C . NH2
    |   |                                    |   |
Cl C    C — N . C6 H11 O5    ——>       Cl C    C — N . C6 H11 O5   ——>
    ||  ||     >C . Cl                       ||  ||     >CH
    N — C — N                                N — C — N
  Dichloradeninglukosid                 Monochlor-2-adeninglukosid.

      HN — CO                                  HN — CO
      |    |                                   |    |
——> Cl C    C — N . C6 H11 O5   ——>   NH2 . C      C — N . C6 H11 O5
      ||   ||     >CH                          ||   ||     >CH
      N — C — N                                N — C — N
  2-Chlorhypoxanthinglukosid                 Guanin-d-glukosid.
```

Chloradenin-d-glukosid: 2 *g* Dichloradenin-d-glukosid (Darstellung bei der Synthese des Adeninglukosids) werden

[1]) *E. Fischer* und *B. Helferich*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 210 (1914).

im Einschlußrohr mit 60 bis 70 *cm*³ Wasser und 8 *g* Zinkstaub im Schüttelölbad 5 Stunden auf 140° erhitzt. Beim Öffnen des erkalteten Rohres entweicht reichlich Wasserstoff. Der Inhalt wird herausgespült, auf 150 *cm*³ verdünnt, heiß vom Zinkstaub abfiltriert und unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Versetzt man den zurückbleibenden Sirup mit 15 *cm*³ heißem Wasser und gibt 1 *cm*³ Essigsäure (50%) hinzu so scheidet sich beim Aufbewahren bei 0° das Glukosid langsam in zu Garben vereinigten Nadeln ab. Ausbeute 1·4 *g* (77% der Theorie). Das Glukosid sintert gegen 190° und beginnt bei 225° sich zu bräunen und verkohlt beim weiteren Erhitzen ohne zu schmelzen. *Fehling*sche Lösung reduziert es nicht.

Guanin-d-glukosid: Das Monochloradeninglukosid wird durch salpeterige Säure in ein Produkt verwandelt, das nach seiner Bildungsweise wahrscheinlich ein 2-Chlorhypoxanthinglukosid ist. Für seine Bereitung wird 3 *g* Chloradeninglukosid in 150 *cm*³ Wasser gelöst, 5 *g* Natriumnitrit und 6 *cm*³ Eisessig zugefügt und die Flüssigkeit bei 25° aufbewahrt, wobei träge Entwicklung von Stickstoff stattfand. Nach 7 Stunden fügt man wieder 3 *g* Natriumnitrit und 4 *cm*³ Eisessig zu. Nach weiteren 12 Stunden wird die Lösung unter vermindertem Druck aus einem Bade von 35 bis 40° zur Trockne verdampft. Als Rückstand bleibt ein gelber, dicker Sirup. Um daraus das Ch'orhypoxanthinglukosid zu isolieren, wird, mit 50 *cm*³ Wasser versetzt, 10 *g* Bleiazetat zugegeben, durch Ammoniak gefällt, der Niederschlag abgesaugt, gewaschen, abgepreßt, hierauf wieder in verdünnter Essigsäure gelöst, mit Schwefelwasserstoff gefällt und das farblose Filtrat unter vermindertem Druck verdampft. Aus ökonomischen Gründen wird auf die Reinigung des Chlorhypoxanthinglukosids verzichtet und der schwach gelblich gefärbte Sirup direkt auf das Guaninderivat verarbeitet. Zu diesem Zweck wird der Sirup mit 10 *cm*³ wässerigem Ammoniak von 25% aufgenommen, mit 100 *cm*³ einer bei 0° gesättigten, alkoholischen Ammoniaklösung verdünnt und im geschlossenen Gefäß 5 Stunden auf 145 bis 150° erhitzt. Nach dem Erkalten ist Chlorammonium ausgeschieden. Die braune Flüssigkeit wird unter vermindertem Druck verdampft, der dunkle Rückstand mit 100 *cm*³ warmem Wasser ausgelaugt und das Filtrat mit Bleiazetat und Ammoniak gefällt. Den Bleiniederschlag löst man in 150 *cm*³ Wasser und 5 *cm*³ Eisess'g, entbleit durch Schwefelwasserstoff, versetzt das Filtrat zur Neutralisation der geringen Menge beigemengter Salzsäure mit einigen Tropfen Ammoniak und verdampft die Flüssigkeit unter geringem Druck. Den schwach braunen, gallertigen Rückstand löst man mit 35 *cm*³ warmem Wasser und bewahrt die Flüssigkeit 20 Stunden bei 35° auf. Es scheidet sich dann das Guaninglukosid als hellbraune, kristallinische Masse ab. Durch Umlösen des Präparates aus 15 *cm*³ heißem Wasser unter Zusatz von Tier-

kohle erhält man feine, farblose, glänzende Nadeln, welche die Flüssigkeit breiartig erfüllen. Ausbeute 0·25 *g*. Das Glukosid schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 298° unter Braunfärbung und starker Gasentwicklung. Es löst sich in kaltem Wasser schwer, leicht in heißem Wasser. Von verdünnten Säuren und Alkalien wird es leicht aufgenommen. $[\alpha]_D^{15} = -41{\cdot}94^0$ in n - Natronlauge.

Synthese des Theophyllinrhamnosids[1]).

```
CH3 . N — CO
      |    |
     OC    C — N — C6 H11 O4
      |    ||    >CH
CH3 N — C — N
```

oder

```
CH3 . N — CO
      |    |
     OC    C — N
      |    ||    >CH
CH3 . N — C — C6 H11 O4
```

8·2 *g* scharf getrocknetes Theophyllinsilber wird mit einer Lösung von 10 *g* Acetobromrhamnose[2]) in 40 *g* scharf getrocknetem Xylol 15 Minuten unter öfterem kräftigen Schütteln am Rückflußkühler gekocht und die noch heiße Lösung vom gebildeten Bromsilber abfiltriert. Beim Erkalten scheidet sich wenig Theophyllin aus (zirka 0·5 *g*). Die abermals filtrierte Lösung hinterläßt beim Verdampfen unter vermindertem Druck einen schwach gelb gefärbten Sirup. Löst man ihn in der zwei- bis dreifachen Menge reinen Essigäthers, so scheidet sich nach mehrstündigem Stehen in der Regel noch eine Spur Theophyllin aus. Wird dann die Essigätherlösung mit dem sechs- bis achtfachen Volumen Petroläther versetzt, so ällt ein Sirup, der in zirka 30 cm^3 Alkohol gelöst wird. Beim längeren Stehen dieser alkoholischen Lösung im Eisschrank pflegt die Kristallisation einzutreten. Auch die vom Sirup abgegossene Essigäther-Petrolätherlösung scheidet bei längerem Stehen große Kristalle des Acetylkörpers aus. Ist man einmal im Besitz von Kristallen, so läßt sich die Operation in der Weise abkürzen, daß man direkt den beim Verdampfen des Xylols bleibenden Sirup in Alkohol löst und nach Eintragen von Imp kristallen stehen läßt.

---

[1]) *E. Fischer* und *K. v. Fodor*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1058 (1914).

[2]) Acetobromrhamnose wird aus der sirupösen Acetylrhamnose mit Eisessigbromwasserstoff hergestellt und soll nur kristallisiert zu dieser Synthese verwendet werden.

Ausbeute 8 *g* (62% der Theorie). Aus Alkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 135 bis 136°.

10 *g* Acetylkörper werden in 70 cm^3 heißem, trockenem Methylalkohol gelöst und das gleiche Volumen einer kaltgesättigten, methylalkoholischen Ammoniaklösung zugegeben. Nach dreieinhalbstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird kurz aufgekocht, dann unter vermindertem Druck eingedampft und der farblose, feste Rückstand in etwa 30 cm^3 heißem Alkohol gelöst. Bei mehrstündigem Stehen im Eisschrank fällt das Rhamnosid zum größten Teil als fast farblose, kristallisierte Masse aus. Ausbeute 6·3 *g* (87% der Theorie). Nach zweimaligem Umlösen aus Alkohol Schmelzpunkt 169 bis 170°. Es ist in Wasser sehr leicht löslich, ebenso in warmem Alkohol. In den anderen organischen Lösungsmitteln ist es fast unlöslich. Bei kurzem Kochen reduziert es *Fehling*sche Lösung nicht. Phosphorwolframsäure gibt mit einer nicht zu verdünnten Lösung eine Fällung. $[\alpha]_D^{22} = -77{\cdot}97°$ (in wässeriger Lösung).

In gleicher Weise, aber mit sehr schlechter Ausbeute läßt sich auch das Theobrominrhamnosid herstellen.

Synthese von Pyrimidinglukosiden.

Darstellung des 2-Thiourazilditetraacetylglukosids[1])

$$C_4 H_2 O N_2 S. \ (C_6 H_7 O_5 [C_2 H_3 O_4])_2.$$

Das Thiourazil wird nach der Vorschrift von *Wheeler* und *Liddle*[2]) hergestellt. Zur Umwandlung in das Silbersalz wird es in der 100fachen Menge heißen Wassers gelöst und unter kräftigem Umschütteln die für 2 Moleküle berechnete Menge Silbernitrat als ziemlich konzentrierte, wässerige Lösung zugefügt. Dabei fällt das Silbersalz als schwach gelb gefärbter, amorpher, etwas gallertiger Niederschlag aus, der ziemlich schwer zu filtrieren ist. Es wird sorgfältig mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und zum Schluß bei 138° unter 10 bis 15 *mm* 6 Stunden getrocknet.

10 *g* des Salzes werden mit einer Lösung von 16 *g* Acetobromglukose in 130 cm^3 trockenem Xylol 2 Stunden im Ölbad gekocht und der von Zeit zu Zeit zusammenbackende Niederschlag mit Hilfe eines Glasstabes öfters zerkleinert. Bei gut gelungener Operation ist nun die Flüssigkeit frei von Brom. Sie wird filtriert und in viel Petroläther eingegossen, wobei ein farbloser, amorpher Niederschlag entsteht. Dieser wird in Azeton gelöst, die Lösung mit Alkohol versetzt und dann das Azeton weggekocht. Es scheiden

[1]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1390 (1914).

[2]) *Wheeler* und *Liddle*: Amer. Journ. of chem. **40**. 547; Zentralbl. **1909**. I. 447.

sich feine, sternförmig vereinte Nädelchen aus. Ausbeute 12 *g*. Schmelzpunkt 230°. Löslich ziemlich leicht in warmem Chloroform, Azeton und Benzol. In Wasser fast unlöslich. Da die Substanz durch warme Alkalien zersetzt wird, entfärbt sie auch beim Kochen *Fehling*sche Lösung. $[\alpha]_D^{19} = -12{\cdot}44^0$ (in Azetylentetrachlorid gelöst).

Darstellung des 2-Äthylthiouraziltetraacetylglukosids[1].

$C_6H_7ON_2S \,.\, C_6H_7O_5(C_2H_3O)_4$.

Das 2-Äthylthiourazil wird nach den Angaben von *Wheeler* und *Merriam*[2]) hergestellt. Man löst 3 *g* 2-Äthylthiourazil in 30 cm^3 heißem Wasser und fügt eine möglichst neutrale ammoniakalische Lösung von 3·3 *g* Silbernitrat zu. Beim Kochen fällt das Silbersalz rasch in farblosen Nädelchen aus, die nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator auf 135° unter 10 bis 15 *mm* Druck kaum an Gewicht abnehmen. 14 *g* dieses Silbersalzes werden mit einer Lösung von 20 *g* Acetobromglukose in 250 cm^3 trockenem Xylol 10 Minuten gekocht und tüchtig umgeschüttelt, dann die bromfreie Lösung abfiltriert und unter vermindertem Druck verdampft. Der Rückstand erstarrt nach einigen Stunden kristallinisch. Er wird in der dreifachen Menge Alkohol gelöst und Petroläther bis zur Trübung zugesetzt. Beim guten Abkühlen kristallisieren feine Nädelchen, die nach einigem Stehen bei 0° abgesaugt werden. Ausbeute 23 *g*. Schmelzpunkt 108°. In kaltem Wasser ist die Substanz sehr schwer löslich, in heißem Wasser schmilzt sie und löst sich dabei in nicht unerheblicher Menge. In den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln, außer Petroläther, ist sie, zumal beim Erwärmen, sehr leicht löslich. Sie reduziert *Fehling*sche Lösung beim Kochen nur langsam. Mit flüssigem Ammoniak wird sie bei 15stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur völlig verändert. Es entsteht Acetamid und ein in Wasser sehr leicht löslicher Körper, der vielleicht das freie Glukosid ist, aber wegen seiner schweren Kristallisierfähigkeit bisher nicht untersucht werden konnte. $[\alpha]_D^{19} = +3{\cdot}14^0$ (gelöst in Azetylentetrachlorid).

Die Versuche, aus den Acetylkörpern die freien Glukoside der Urazile zu gewinnen, haben bisher zu keinem Erfolg geführt, da sie sehr schwer kristallisieren. Bei der Einwirkung von Acetobromglukose auf Silbersalze des Urazils und Zytosins hat *E. Fischer* bisher nur amorphe Körper erhalten, die bei der Abspaltung der Acetylgruppen sich unter Rückbildung von Urazil und Zytosin zersetzen.

[1]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1391 (1914).
[2]) *Wheeler* und *Merriam*: Amer. Journ. of chem. **29**. 484 (1903).

Kondensation von Traubenzucker mit 1.3-Dimethyl-2.6-dioxy-4.5-diaminopyrimidin[1]**.**

```
                              O
                            /    \
CH3.N —CO                 /        \
   |    |               /            \
  OC    C —NH.CH.CHOH.CHOH.CH.CHOH.CH2OH.
   |    ||
CH3.N --C.NH2
```

Zur Lösung von 1·7 *g* 1.3-Dimethyl-2.6-dioxy-4.5-diaminopyrimidin[2]) in siedendem Wasser wird die äquimoleküle Menge Traubenzucker (1·8 *g*) gegeben, die gelbe Lösung auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig siedendem Wasser gelöst und die heiße Lösung mit der zehn- bis zwölffachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Es fallen rasch farblose Kristallplättchen aus. Bei langsamer Ausscheidung fällt die Substanz zum Teil in Gestalt feiner, lockenförmig gekrümmter Kristallnädelchen aus. Durch zweimaliges Lösen in Wasser und Fällen mit absolutem Alkohol erhält man ein fast weißes Kristallisat, das, mit konzentrierter Salpetersäure auf einem Porzellandeckel betupft, keine Farbenreaktion mehr gibt und in heißem Wasser sehr leicht, in kaltem ziemlich le cht löslich ist. Die Substanz schmilzt bei 206 bis 207° unter Aufsteigen zu einer dunkelbraunen Flüssigkeit. Auf die gleiche Weise lassen sich Milchzucker, Galaktose und Maltose mit dem Diaminopyrimidin kondensieren.

Kondensation von Traubenzucker mit 2.6-Dioxy-4.5-Diaminopyrimidin[3]**.**

```
                          O
                        /   \
HN —CO                /       \
 |   |              /           \
OC   C — NH — CH.CHOH.CHOH.CH.CHOH.CH2.OH
 |   ||
HN   C — NH2
```

---

[1]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1304 (1914).

[2]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3052 (1900). Dieses Handbuch S. 148 (voriges Kapitel).

[3]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1307 (1914).

1·2 *g* des Sulfates des 2.6-Dioxy-4.5-diaminopyrimidins[1]) werden in siedendem Wasser gelöst, die Lösung mit 10%iger Natronlauge genau neutralisiert und hierauf mit 6·3 *g* Traubenzucker versetzt. Die gelbe Lösung wird auf dem Wasserbad ungefähr auf 2 Drittel des ursprünglichen Volumens eingeengt und dann im Föhnwind bei zirka 45° fast völlig abgedampft. Der orangefarbene Rückstand, der undeutlich kristallisiert ist, wird mit viel kaltem Wasser zur Lösung des überschüssigen Zuckers versetzt und abfiltriert. Er wird mit Sprit und Äther nachgewaschen und aus 30%iger siedender Traubenzuckerlösung umkristallisiert. Man behandelt zuerst mit wenig Zuckerlösung, wodurch viel Verunreinigung in Lösung geht. Aus den rasch abgekühlten Zuckerlösungen fällt allmählich reichlich hellgelbes Kristallisat, das aus kleinen Nädelchen besteht. Nach zweimaligem Umkristallisieren ist die Substanz rein. Bei langsamem Erhitzen schmilzt die Substanz unter Zersetzung bei 186 bis 187° zu einer tiefbraunen Flüssigkeit, bei raschem Erhitzen liegt der Schmelzpunkt bei 205 bis 206°. Mit konzentrierter Salpetersäure betupft, gibt die Substanz keine Farbenreaktion. Durch Kochen mit Wasser wird die Substanz zersetzt.

Der Körper ist mit dem Pyrimidinglukosid Vizin, das *Ritthausen* aus Wicken- und Saubohnensamen isoliert hat, wahrscheinlich isomer.

Synthese des Phosphorsäureesters des Theophyllinglukosids[2]).

(Theophyllinnukleotid)

$C_{13} H_{16} O_7 N_4 . P O_2 H.$

Die Synthese aus Theophyllinglukosid vollzieht sich durch Einwirkung von Phosphoroxychlorid und Pyridin auf Theophyllinglukosid. Die angewandten Materialien müssen ganz trocken sein. Deshalb wird das fein gepulverte Theophyllinglukosid im Hochvakuum (0·15 *mm*) bei 78° mehrere Stunden über Phosphorpentoxyd getrocknet, während das Pyridin 6 Stunden mit überschüssigem Bariumoxyd unter Rückfluß gekocht und zum Schluß darüber destilliert wird.

10 *g* Theophyllinglukosid werden in 100 cm^3 heißem Pyridin gelöst, auf —20° abgekühlt und mit einer Mischung von 4·6 *g* (etwa 1 Molekül) Phosphoroxychlorid und 10 cm^3 Pyridin, die ebenfalls auf —20° abgekühlt sind, versetzt. Die klare, farblose Mischung bleibt 50 Minuten bei —20° stehen, wird dann mit einer stark abgekühlten Mischung von 10 cm^3 Pyridin und 10 cm^3 Wasser versetzt und nach weiteren 15 Minuten aus dem Kühlbad

[1]) *W. Traube*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 3035 (1900).
[2]) *E. Fischer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 3197 (1914).



entfernt. Nach einer weiteren viertel Stunde fügt man 300 cm^3 eiskaltes Wasser hinzu, schüttelt zur Entfernung der Salzsäure mit 20 *g* Silbersulfat und fällt aus der filtrierten Flüssigkeit das überschüssige Silber durch Schwefelwasserstoff. Die abgesaugte Flüssigkeit, die kaum noch Schwefelwasserstoff enthalten soll, wird zur Entfernung des Pyridins mit 50 *g* reinem, kristallisiertem, feingepulvertem Bariumhydroxyd versetzt, auf 1 *l* verdünnt und unter einem Druck von 10 bis 15 *mm* auf einem Bad von nicht mehr als 40° verdampft.

Das Pyridin ist gewöhnlich nach 1½ bis 2 Stunden völlig verjagt. Man leitet nun in die Flüssigkeit Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion ein, saugt über etwas Tierkohle ab und verdampft das Filtrat unter demselben geringen Druck auf etwa 75 cm^3. Das hiebei ausgeschiedene Bariumkarbonat wird abgesaugt und das Filtrat in 1 *l* absolutem Alkohol unter Umrühren eingegossen. Dabei fällt das Bariumsalz der Theophyllinglukosidphosphorsäure als farblose, amorphe Masse aus, die sich gut absaugen und mit Alkohol und Äther waschen läßt. Ausbeute 12 *g*.

Um die reine kristallisierte Theophyllinglukosidphosphorsäure zu erhalten, löst man das Bariumsalz in etwa der zehnfachen Menge Wasser, fällt das Barium genau mit Schwefelsäure, konzentriert das Filtrat zunächst bei 10 bis 15 *mm* Druck und bringt dann in den Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd. Nach einiger Zeit beginnt die Abscheidung sehr feiner Nädelchen, deren Menge sich ziemlich rasch vermehrt. Sie werden schließlich abgesaugt, zuerst mit 50%igem, dann mit absolutem Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen. Ausbeute an diesem schon recht reinen Produkt ungefähr 5·3 *g* aus 12 *g* Bariumsalz. Die wässerige Mutterlauge gibt beim weiteren Eindunsten eine neue, aber unreine Kristallisation. Schließlich bleibt ein Sirup zurück, der andere Phosphorsäurederivate enthält. Die kristallisierte Theophyllinglukosidphosphorsäure ändert beim Umkristallisieren aus warmem Wasser ihr Drehungsvermögen nicht, ist also offenbar schon recht rein. Allerdings werden beim Umkristallisieren öfters an Stelle der Nädelchen regelmäßige, meist sternförmig vereinigte, längliche Blättchen beobachtet, aber sie unterscheiden sich weder in der Zusammensetzung noch im Drehungsvermögen von den Nadeln. Die kristallisierte Säure enthält im lufttrockenen Zustand Kristallwasser, das beim Trocknen im Hochvakuum bei 78° entweicht (2 Moleküle Kristallwasser). Das getrocknete Präparat zieht an der Luft rasch wieder Feuchtigkeit an. Die trockene Theophyllinglukosidphosphorsäure hat keinen Schmelzpunkt. Von 200° an sintert sie stark und färbt sich braun, bei Steigung der Temperatur tritt allmählich völlige Zersetzung ein. $[\alpha]_D^{26} = -29{\cdot}76°$ (in

wässeriger Lösung). Die Säure löst sich leicht in Wasser, in kaltem Wasser schwerer als in heißem. Eine 5%ige Lösung bleibt bei 0° klar. In den gewöhnlichen, indifferenten organischen Lösungsmitteln ist sie außerordentlich schwer oder gar nicht löslich. Sie reduziert *Fehling*sche Lösung bei kurzem Aufkochen nur schwach. Die Säure gibt weder mit Tannin noch mit Hühnereiweiß eine Fällung. Ihre Lösung wird durch eine konzentrierte Lösung von Phosphorwolframsäure nicht gefällt, wohl aber gelblichrot verfärbt. Verwandelt man an Stelle der wässerigen Lösung eine Lösung der Phosphorwolframsäure in 20%ige Schwefelsäure, so entsteht sofort ein harziger Niederschlag, der allmählich fest wird und bei längerem Stehen kristallinische Struktur annimmt. In Wasser ist der Niederschlag löslich, wird aber durch 10%ige Schwefelsäure wieder gefällt. Bei der Titration mit Natronlauge erweist sich die Theophyllinglukosidphosphorsäure als einbasische Säure[1]). Beim Stehen mit Alkali oder Bariumhydroxyd geht sie in eine zweibasische Säure über und zersetzt sich allmählich. Es können durch kurzes Aufkochen mit Bariumhydroxyd Bariumsalze isoliert werden, die einer ein- und zweibasischen Säure entsprechen. Diese Bariumsalze sind nicht kristallisiert. Aus dem Bariumsalz der zweibasischen Säure kann diese Säure durch Zerlegen mit Schwefelsäure in Freiheit gesetzt werden. Sie kristallisiert beim Einengen der Mutterlauge, jedoch ist die Ausbeute an kristallisierter Substanz so schlecht, daß bisher ihre Identität als zweibasische Theophyllinglukosidphosphorsäure nicht festgestellt werden konnte.

---

[1]) *E. Fischer* vermutet, daß der Phosphorsäurerest mit zwei Alkoholgruppen des Zuckerrestes verkuppelt ist. Die kristallisierte Säure würde also der sekundäre Phosphorsäureester des Glycosides sein.

Lieferung 26

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

Unter Mitarbeit von über 400 bedeutenden Fachmännern herausgegeben von
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Emil Abderhalden
Direktor des Physiologischen Institutes der Universität Halle a. d. Saale

Abt. I, Chemische Methoden, Teil 8, Heft 2

Zusammengesetzte Eiweißkörper-Proteide
(Blutfarbstoffe und ihre Spaltprodukte)

Fr. N. Schulz-Jena:

Darstellung von Blutfarbstoffen

William Küster-Stuttgart:

Die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes, ihr Nachweis und ihre Derivate

---

Studien auf dem Gebiete der Porphyrine

Der Abbau des Hämatins und der Porphyrine und die Synthese der Spaltungsprodukte

---

Synthesen mehrkerniger Pyrrolderivate und die Konstitution des Hämins

---

Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte des Bilirubins

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 B

Urban & Schwarzenberg
1921

Wien I
Mahlerstraße 4

Darstellung von Blutfarbstoffen.

Von **Fr. N. Schulz**, Jena.

I. Oxyhämoglobin und verwandte Blutfarbstoffe[1]).

A. Darstellung von Oxyhämoglobin nach *Hoppe-Seyler*[2]).

Das Verfahren beruht auf einer kombinierten Anwendung von Alkohol und Kälte. Bei der Kristallisation bestehen zwei Gefahren, einmal die Verunreinigung der Kristalle durch anhaftende Serumeiweißstoffe und zweitens durch anhaftende Stromata der roten Blutkörperchen. Die erstere Gefahr ist früher überschätzt worden, denn nach *Zinnoffsky*[3]) wird tatsächlich unter den Bedingungen, welche bei der Kristallisation in Betracht kommen, kein Eiweiß gefällt. Wegen der Gefahr der Adsorption ist es trotzdem nötig, die Blutkörperchen gründlich auszuwaschen vor der weiteren Verarbeitung. Zur Beseitigung der Stromata, welche andernfalls nicht nur den Kristallen außen anhaften, sondern auch in die Kristalle eingeschlossen sind, empfahl *Hoppe-Seyler* die Blutfarbstofflösung mit reichlich Äther auszuschütteln. Stromata lassen sich dann mikroskopisch nicht mehr nachweisen. Statt Äther können auch andere indifferente Lipoidlösungsmittel, wie Chloroform, Benzin, in gleicher Weise angewandt werden. Bei Verwendung von Benzin soll nach *Mayet*[4]) die Kristallisation sogar besonders reichlich erfolgen. Im allgemeinen wird man aber gut tun, beim altbewährten Äther zu bleiben.

[1]) Siehe die zusammenfassenden Darstellungen bei *a*) *Fr. N. Schulz*: Die Kristallisation von Eiweißstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweißchemie. Verlag *Gustav Fischer*, Jena 1901, 39 S.; *b*) *H. U. Kobert*: Das Wirbeltierblut in mikrokristallographischer Hinsicht. Verlag *Enke*, Stuttgart 1901, 118 S. mit 6 Abb.; *c*) *K. Bürker*: Gewinnung, quantitative und qualitative Bestimmung des Haemoglobins. Handb. d. physiolog. Methodik. Bd. II, Abt. I. S. 68—346. (1910).

[2]) Die ersten Angaben über Darstellung von Blutfarbstoffkristallen nach den Kälte-Alkoholverfahren finden sich bei *Hoppe-Seyler*: Beiträge zur Kenntnis des Blutes des Menschen und der Wirbeltiere. Med.-chem. Unters. H. 2, S. 181 bis 185 (1867). Das Verfahren ist später von *Hoppe-Seyler* mehrfach modifiziert (siehe die verschiedenen Auflagen des Handbuches der physiologisch-chemischen Analyse sowie dessen „Physiologische Chemie", S. 372 bis 375 (1879).

[3]) *O. Zinnoffsky*: Die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**. 16 bis 34 (1885).

[4]) *Mayet*: Verbesserung des Verfahrens der Darstellung des kristallisierten Hämoglobins nach *Hoppe-Seyler*: Das Verfahren zur Herstellung dieses Körpers. Compt. rend. **109**. 156 bis 158 (1890).

Zinnoffsky (l c.) hat einer mündlichen Mitteilung *Alexander Schmidts* folgend, zur Lösung bezw. Aufquellung der Stromata eine verdünnte Ammoniaklösung empfohlen, die nachher mit einer verdünnten Salzsäurelösung neutralisiert wird. Man riskiert dabei, daß das leicht zersetzbare Hämoglobin auch bei Verwendung ganz dünner Ammoniaklösungen angegriffen wird (*Hüfner*[1]). Auch durch Erzeugung indifferenter Niederschläge lassen sich die Stromata entfernen (z. B. mit Baryt). Wesentliche Vorteile bieten diese Modifikationen nicht.

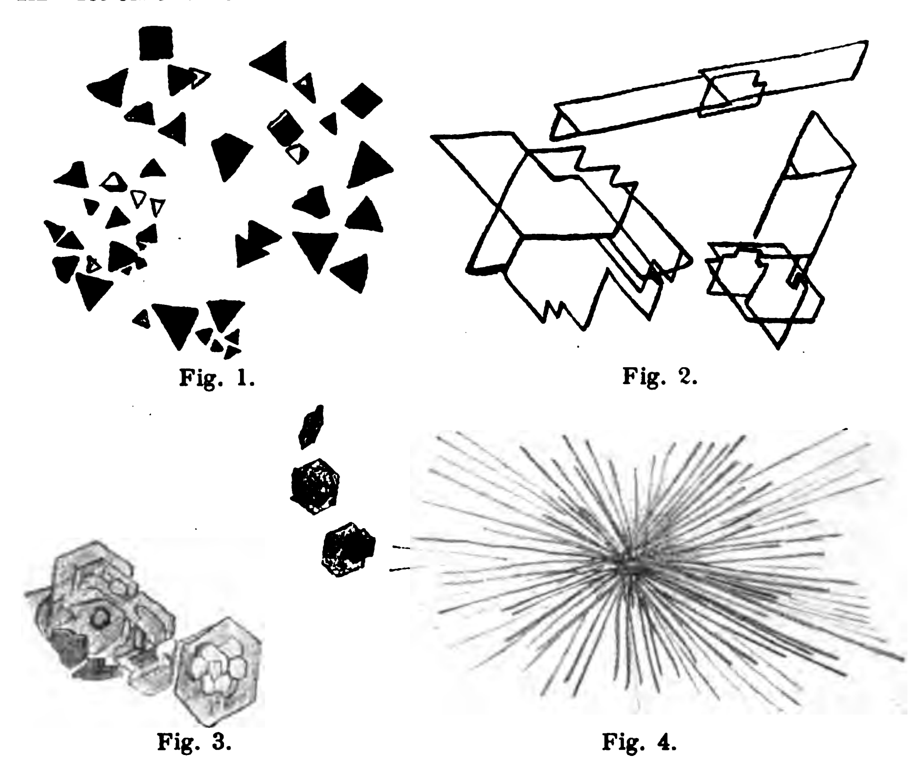


Fig. 1. Fig. 2.

Fig. 3. Fig. 4.

Das Hämoglobin der verschiedenen Blutarten zeigt ein sehr verschiedenes Kristallisationsvermögen, was zum Teil sicherlich in der verschiedenen Löslichkeit des Blutfarbstoffes beruht. Dem kann man zum Teil begegnen, indem man je nach der Blutart zum Auflösen der Blutkörperchen mehr oder weniger Wasser benützt. Das Pferdebluthämoglobin rechnet zu den verhältnismäßig leicht kristallisierenden Blutarten. Nach *Zinnoffsky* (l. c.) soll man den Blutkörperchenbrei mit dem dreifachen Volum Wasser zur Auflösung bringen. *Abderhalden* nimmt das doppelte Volum und erhält dabei eine allerdings langsamere Kristallisation, dafür aber besser

[1]) *G. Hüfner*: Beitrag zur Lehre vom Blutfarbstoff. Festschrift *G. Ludwig* 1887. S. 74 bis 78 (1898).

ausgebildete Kristalle und sehr gute Ausbeute (zirke 80%). Auch für Hundeblut empfiehlt *Abderhalden*[1]) nur das doppelte Volum Wasser zum Auflösen der Blutkörperchen hinzuzugeben. Katzenhämoglobin kristallisiert nach *Abderhalden*[2]) überhaupt nur wenn man nicht mehr als das gleiche Volum Wasser anwendet. Nach *Gescheideln*[3]) wird die Kristallisierbarkeit des Hämoglobins wesentlich erhöht, wenn man das Blut zunächst einer kurzen Fäulnis im Brutofen unterwirft. Wegen der verschiedenen Kristallformen siehe Fig. 1 bis 4.

Darstellung kristallisierten Hämoglobins nach Hoppe-Seyler[4]).

Möglichst frisches defibriniertes Pferde- oder Rinderblut wird in Glasgefäßen von zirka 5 *cm* Durchmesser und 18 *cm* Höhe (zirka 200 cm^3 Inhalt) zentrifugiert, das Serum abgehoben, zu dem Blutkörperchenbrei ein dem Serum gleiches Volum physiologische Kochsalzlösung hinzugesetzt und nochmals zentrifugiert. Je nach Bedarf wird die Befreiung des Blutkörperchenbreis von Serumbestandteilen durch Waschen mit Kochsalzlösung noch einige Male wiederholt.

Der gereinigte Blutkörperchenbrei wird in möglichst wenig destilliertem Wasser von 37° gelöst, auf 0° abgekühlt, mit der Hälfte des Volums reinem, gleichfalls abgekühltem Äther versetzt und nunmehr alle Manipulationen in einem möglichst kühlen Raum vorgenommen. Die Lösung wird dort in einen verschließbaren Scheidetrichter gefüllt und im Verlauf eines Tages mehrere Male tüchtig durchgeschüttelt. Dann läßt man sie einen weiteren Tag ruhig stehen, wobei sich drei Schichten bilden, eine untere klare, welche den größten Teil des $Hb\ O_2$ in wässeriger Lösung enthält, eine mittlere, gelatinöse Schicht mit den Blutkörperchenresten, eine obere, zum größten Teil aus Äther bestehend.

Durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes am Scheidetrichter läßt man die untere klare Schicht in ein Becherglas abfließen, solange sie in dem Abflußrohr oberhalb des Hahnes vollständig klar erscheint; sowie aber dort die ersten wolkigen Trübungen sichtbar werden, unterbricht man sofort den Abfluß und läßt einige Stunden stehen. Hat sich dann wieder klare Lösung abgeschieden, so läßt man sie ablaufen und setzt diese Operation so lange fort, als überhaupt noch klare Lösung zu erhalten ist.

Die so erzielte Lösung wird mit einer mit Fließpapier belegten Nutsche und einer Saugpumpe in eine größere, sorgfältig gereinigte

[1]) *E. Abderhalden*: Die Resorption des Eisens, sein Verh. i. Org. u. seine Ausscheidung. Zeitschr. f. Biol. **39**. 143 (1901).

[2]) *E. Abderhalden*: Die Beständigkeit des Hämoglobingehaltes im Katzenblut. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 545 bis 547 (1898).

[3]) *Gescheideln*: Einfache Methode Blutkristalle zu erzeugen. *Pflügers* Arch. **16**. 421 bis 423 (1878).

[4]) Siehe bei *Bürker* l. c. S. 93.

Glasschale filtriert, in welcher die Hb O_2-Lösung dadurch von Äther befreit wird, daß man mit der Saugpumpe einen Luftstrom hindurchtreibt. Der Luftstrom muß vorher eine mit konzentrierter Kaliumpermanganatlösung und eine mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Gaswaschflasche passiert haben. Die Befreiung der Lösung von Äther äußert sich schließlich dadurch, daß die Lösung stark zu schäumen beginnt, wobei dann auch der Geruch nach Äther verschwindet.

Darauf wird die Lösung, sofern sie nicht an sich schon 0° kalt ist, auf diese Temperatur abgekühlt und, sofern Pferde-Hb O_2 oder ein anderes schwer lösliches Hb O_2 vorliegt, mit einem Viertel ihres Volums, sofern Rinder-Hb O_2 oder ein anderes leicht lösliches Hb O_2 zur Kristallisation gebracht werden soll, mit einem Drittel ihres Volums gleichfalls auf 0° abgekühlten Alkohol langsam und unter häufigem Umschwenken versetzt, um eine Fällung des Farbstoffes zu verhindern. Nach dem Vermischen der Lösung mit Alkohol kommt die Flasche samt Inhalt in eine Kältemischung von Eis und Viehsalz, worin die Temperatur der Lösung bis auf —20° sinkt. Die Kältemischung muß morgens und abends, bei Bedarf auch öfters, erneuert werden. Der Beginn der Kristallisation äußert sich dadurch, daß die Lösung eine sulzige Beschaffenheit annimmt; dann schüttelt man die Masse öfters tüchtig durch und packt sie immer wieder in Kältemischung ein. Bei Pferde-Hb O_2 wird die Kristallisation meist schon nach zwölf Stunden, bei Rinder-Hb O_2 schon nach 24 Stunden beendigt sein.

Alsdann gießt man die über dem Kristallbrei stehende Mutterlauge ab, füllt den Brei in die Gläser der Zentrifuge ein, zentrifugiert und hebt den Rest der Mutterlauge vollends ab.

Darauf schreitet man zur zweiten Kristallisation, ohne Alkohol. Zu dem Zweck wird der Kristallbrei zunächst mit eiskaltem Wasser gewaschen, in möglichst wenig destilliertem Wasser von 37° C gelöst, die Lösung einer Kälte von etwa —3° ausgesetzt und mit ausgewaschenen Kristallen der vorhergehenden Fraktion geimpft; jetzt dauert die Kristallisation längere Zeit. Wiederum wird nach erfolgter Kristallisation zentrifugiert, die Mutterlauge abgehoben, der Kristallbrei gelöst und nach Bedarf noch einige Male in der angegebenen Weise umkristallisiert.

Der schließlich erhaltene Kristallbrei wird entweder gelöst und die Lösung eventuell noch dialysiert, oder er wird, wenn feste Substanz gewünscht wird, vorläufig dadurch getrocknet, daß er auf englische Tonsteine (Putzsteine) oder auf dicke Filtrierpapierplatten von *Schleicher* und *Schüll* (in Düren) aufgegossen wird. Die oberen Schichten der festen Kristallmasse löst man alsdann ab, bringt sie zirka 36 Stunden ins Vakuum über Schwefelsäure, pulverisiert in einer Glasschale und trocknet das Pulver vollends in

einer 105° nicht übersteigenden Temperatur, indem man es in Glasgefäßen (siehe Figur 5 und 6) in ein Bad mit siedendem Toluol einsetzt und reinen trockenen Wasserstoff in beständigem Strom über das Pulver hinwegleitet.

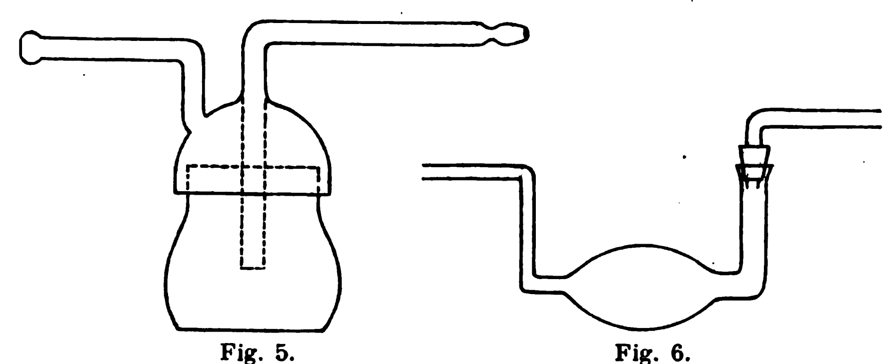


Fig. 5. Fig. 6.
Gefäße zum Trocknen des Hb O_2 nach *G. Hüfner.* (1/2 natürlicher Größe.)

Besondere Bedingungen bietet die Darstellung des Blutfarbstoffes des Vogelblutes vor allem wegen der „sekundären Blutgerinnung". Nach Ablauf der gewöhnlichen Blutgerinnung oder auch gleichzeitig mit derselben vollzieht sich, namentlich bei Einwirkung chemisch differenter Stoffe, wozu auch 1%ige Kochsalzlösung gehört, eine Umwandlung von Eiweißstoffen der Blutkörperchen (Nukleoproteiden), die in der äußeren Form Ähnlichkeit mit der echten Blutgerinnung hat. *Hoppe-Seyler*[1]) hat offenbar nach seiner Methode Oxyhämoglobin aus Gänseblut in zur Analyse hinreichender Menge kristallisiert erhalten. Er berichtet, daß auch aus Enten- und Taubenblut das Oxyhämoglobin ebenso leicht wie aus Gänseblut kristallisiere. Von Schwierigkeiten, die durch die sekundäre Blutgerinnung hervorgerufen werden, erwähnt er nichts. Er gibt an, daß das Blut der Gänse und anderer Vögel beim Behandeln der Blutkörperchen mit Äther und Wasser eine tiefrote, völlig klare Flüssigkeit liefert. *Jaquet*[2]) stieß dagegen bei der Darstellung des Hämoglobins aus Hühnerblut auf Schwierigkeiten. Beim Behandeln der Blutkörperchen mit Äther resultierte eine Gallerte, die sich nicht weiter verarbeiten ließ. Auch Verfasser[3]) hat gelegentlich die gleiche Beobachtung gemacht. Überhaupt haben die Vogelblutkörperchen Neigung zur Gallertbildung. Solche, den Farbstoff einschließenden Gallerte erhält man z. B. beim Versuch, Gänseblutkörperchen mit 1%iger (oder auch 3%iger) Na Cl-Lösung

[1]) *F. Hoppe-Seyler*: Beitr. z. Kenntn. des Blutes der Menschen und der Wirbeltiere. Med.-chem. Unters. **2.** 109 bis 208 (1867).

[2]) *A. Jaquet*: Beitr. z. Kenntn. des Blutfarbstoffes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **14.** 289 bis 296 (1889).

[3]) Anderweitig nicht veröffentlicht.

auszuwaschen. So wird denn auch neuerdings[1]) für Vogel-Amphibien und Fischblut Natriumsulfatlösung statt Na Cl-Lösung zum Auswaschen empfohlen, ohne daß anscheinend eine genauere Erprobung dieser Modifikation stattgefunden hat. *Jaquet*[2]) half sich so, daß er die beim Zusammenbringen von mit dem gleichen Volum Wasser verdünntem Blutkörperchenbrei mit einem Drittel Volum Äther entstehende Gallerte auf 35° erwärmte. Es schieden sich dann dicke Gallertklumpen ab, die durch Zentrifugieren und Filtrieren von einer klaren dunkelroten Farbstofflösung abgetrennt werden konnten. Dementsprechend verfuhren *Abderhalden* und *Medigreceanu*[3]) folgendermaßen:

Ganz frisches geschlagenes Gänseblut wird durch Zentrifugieren und Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung vom Serum befreit. Der Blutkörperchenbrei wird mit der zweifachen Menge Wasser auf 37° erwärmt. Es treten gallertige Klumpen auf. Die warme Lösung wird filtriert, abgekühlt und mit Äther geschüttelt. Oft scheiden sich nochmals gallertige Massen aus. Es wird nochmals filtriert, das Filtrat auf Eis gestellt und dann tropfenweise unter Umrühren ein Viertel Volum Alkohol von 0° hinzugegeben. Oft erfolgt in der Kältemischung rasch Kristallisation. Oft scheiden sich neben Kristallen amorphe Massen ab. Dann ist es vorteilhaft, nochmals auf 37° zu erwärmen und zu filtrieren. Aus Hühner- und Entenblut lassen sich in der gleichen Weise Kristalle gewinnen. Zum Umkristallisieren wird in zwei Volum Wasser von 37° gelöst und unter Abkühlung von neuem mit einem Viertel Volum Alkohol gefällt.

Für das Blut der Seeschildkröte (Talassochelys corticata) hat *Bardachzi*[4]) diese störenden Nachgerinnungen beseitigt, indem er den zentrifugierten Blutkörperchenbrei mit Wasser versetzte und dann einige Stunden auf 50° erwärmte. Dabei bilden sich derbe Gerinnsel, die durch Filtration von der Blutfarbstofflösung abgetrennt werden können. Mit dieser Lösung wird dann nach der *Hoppe-Seyler*schen Vorschrift verfahren.

B. Darstellung von [Oxyhämoglobinkristallen nach dem Dialysationsverfahren.

Da ein reichlicher Gehalt an Alkohol beim *Hoppe-Seyler*schen Verfahren zu teilweiser Koagulation des Blutfarbstoffes führt,

[1]) *Hoppe-Seylers* Handbuch d. physiol. u. path. chem. Analyse. 7. Aufl. von *H. Thierfelder* (1903).

[2]) Anderweitig nicht veröffentlicht.

[3]) *E. Abderhalden* und *F. Medigreceanu*: Zur Kenntnis des Oxyhämoglobins verschiedener Tierarten I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **59.** 165 bis 169 (1909).

[4]) *Franz Bardachzi*: Über den Blutfarbstoff bei Talassochelys corticata. Zeitschr. f. physiol. Chem. **49.** 465 bis 471 (1906).

haben *Arthus*[1]) und unabhängig davon *Frey*[2]) vorgeschlagen, durch Dialyse der Blutfarbstofflösung gegen Alkohol den Alkohol allmählich zuzuführen, und zwar nur so viel, als zur Erzeugung der Kristalle unbedingt erforderlich ist. Dabei kann man auch das Arbeiten mit niedrigen Temperaturen einschränken oder ganz vermeiden. Eine genauere Vorschrift findet man bei *Schuurmanns-Stekhoven*[3]). Mit 1%iger Na Cl-Lösung auf der Zentrifuge gewaschene Blutkörperchen werden zwei Stunden mit Asbestflocken gründlich geschüttelt. Der Blutfarbstoff löst sich dann in der Salzlösung auf. Die Stromata haften den Asbestflocken an und können durch Filtration entfernt werden. So kommt der Blutfarbstoff gar nicht mit Äther in Berührung; man erhält eine sehr konzentrierte Farbstofflösung. Die Blutfarbstofflösung wird in einem Pergamentschlauch in 45%igen Alkohol hereingetan und im Eisschrank dialysiert. Sobald sich Oxyhämoglobinkristalle an der Pergamentwand absetzen (24 bis 40 Stunden), wird der Dialysatorinhalt in ein zylindrisches Gefäß gebracht und bis zur Beendigung der Kristallisation wieder in den Eisschrank gebracht. Zum Umkristallisieren werden die Kristalle bei 37° in möglichst wenig Wasser gelöst und die Lösung wieder im Eisschrank gegen 45%igen Alkohol dialysiert. Dieses Dialysationsverfahren, das einfach zu handhaben ist, wurde bisher nur vereinzelt praktisch benützt. Analysen solcher Kristalle liegen nicht vor.

C. Das Ammoniumsulfatverfahren.

Für manche Blutarten läßt sich auch das Aussalzen mit Ammoniumsulfat zur Darstellung von Kristallpräparaten mit Vorteil benützen. Man kann nach diesem Verfahren insbesondere aus Pferdeblut leicht große Massen Blutfarbstoffkristalle darstellen. Allerdings hat dieses Verfahren den Nachteil, daß eine Verwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin sich nicht vermeiden läßt. Für manche Untersuchungszwecke ist das aber gleichgültig. Die ersten Versuche, Blutfarbstoff mit Ammoniumsulfat kristallinisch darzustellen, hat *Dittrich*[4]) ausgeführt; später hat *Schulz*[5]) ein Verfahren beschrieben, das sich im wesentlichen

[1]) *M. Arthus*: Verfahren, welches gestattet, leicht und schnell Kristalle von Oxyhämoglobin zu erhalten. Compt. rend. soc. biol. **47**. 686 (1895); Zeitschr. f. Biol. **34**. 444 bis 446 (1896).

[2]) *H. Frey*: Beitr. z. Kenntn. d. Blutkristalle. Diss. Würzburg 1894.

[3]) *Schuurmanns-Stekhoven*: Darstellung von kristallinischem Oxyhämoglobin. Onderz. Physiol. Labor. Utrecht. 4. Recks. **1**. 67. Ausführlich beschrieben in der Abhandlung von Klaveren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 296 bis 297 (1901).

[4]) *P. Dittrich*: Über Methämoglobin bildende Gifte. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **29**. 247 bis 281 (1891).

[5]) *Fr. N. Schulz*: Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 449 bis 481 (1898).

mit den Vorschriften deckt, die *Micko*[1]) später gegeben hat. Pferdeblut mit Ammoniumoxalat ungerinnbar gemacht (das Blut wird in 10% einer 1%igen Lösung von Ammoniumoxalat oder Kaliumoxalat aufgefangen), wird mit dem zweifachen Volum Wasser verdünnt und im Eiskasten oder durch Eintragen gewogener Eisstückchen gekühlt. Die abgekühlte Flüssigkeit wird mit Äther (50 bis 70 cm^3 auf 1 *l*) durchgerührt und dann mit 700 cm^3 ebenfalls gekühlter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf jedes Liter Blutlösung unter lebhaftem Umrühren versetzt. Es entsteht ein voluminöser Niederschlag von Fibrinogen und Globulin, der sich nach 5 bis 10 Minuten hebt; wenn nicht, muß man vorsichtig noch etwas Äther hinzusetzen, jedoch nicht zu viel, da sonst eine vorzeitige Kristallisation des Oxyhämoglobins eintritt. Nach einigem Stehen in der Kälte findet sich an der Oberfläche ein blaßroter Niederschlag, während die darunter befindliche Flüssigkeit klar und dunkelgranatrot ist. Die Flüssigkeit wird abgehebert und klar filtriert. Durch die Abkühlung wird eine vorzeitige Kristallisation des Oxyhämoglobins vermieden. Der obenauf schwimmende Niederschlag, der die Stromata vollständig mitgerissen hat, kann durch Filtration in der Kälte ebenfalls noch von der Mutterlauge befreit werden; er enthält dann nur Spuren von Blutfarbstoff. Die erhaltenen klaren Blutfarbstofflösungen werden bei Zimmertemperatur in offenen Schalen unter zeitweisem Umrühren stehen gelassen. Es scheiden sich dann große Kristalle aus, die anfangs leuchtend rot sind, später immer mehr bräunlich werden (Umwandlung in Methämoglobin). Die Kristallmasse wird auf *Büchner*-Filtern zu einem festen Kristallkuchen abgesaugt, der aus prächtigen, großenteils makroskopischen, granatähnlichen Kristallen besteht. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Die Mutterlaugen sind kaum noch gefärbt. Die Kristallmassen lösen sich zunächst leicht in Wasser und können durch Zusatz von konzentrierter Ammoniumsulfatlösung umgefällt werden. Die Fällungen sind dabei aber in der Regel amorph, mit einzelnen Kristallen durchsetzt.

Andere Blutarten (Rinderblut, Gänseblut) eignen sich nicht für dieses Verfahren, dagegen ist es leicht, aus Kaninchenblut schöne Kristalle nach diesem Verfahren zu erhalten.

D. Darstellung nach der Gefriermethode von Offringa[2]).

Da bei der großen Labilität des Oxyhämoglobins bei der Verwendung von Äther zur Auflösung der Blutkörperchen sowie von Alkohol zur Fällung des Farbstoffes die Gefahr von sekundären Ver-

[1]) *C. Micko*, mitgeteilt von *K. Spiro*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 182 (1899).

[2]) *J. Offringa*: Eine neue Methode zur Darstellung von Blutfarbstoffkristallen. Biochem. Zeitschr. **28**. 106 bis 111 (1910).

änderungen besteht, so sucht *Offringa* ohne Benützung chemisch differenter Stoffe zum Ziele zu kommen.

Zunächst handelt es sich darum, möglichst konzentrierte Blutfarbstofflösungen zu bekommen. Defibriniertes Blut wird auf der Zentrifuge durch drei- bis vierfaches Waschen mit isotonischer Rohrzuckerlösung vom Serum befreit. Dann werden die Blutkörperchen noch einmal mit Rohrzuckerlösung gemischt und in Zentrifugierröhrchen von 7 bis 8 *mm* Durchmesser wieder zentrifugiert. Nunmehr wird die Rohrzuckerlösung abpipettiert und dann der Blutkörperchenbrei ebenfalls mit der Pipette in eine Porzellanschale überführt. Dann wird mit Infusorienerde[1]) gemischt, bis das Ganze teigig wird. Die teigige Masse wird in Watte eingehüllt und dann in einer hydraulischen Presse ausgepreßt. Man erhält einen dunkelschwarz gefärbten Preßsaft, aus dem die letzten Reste von Stromata und von Infusorienerde leicht durch Zentrifugieren entfernt werden können.

Aus dieser Blutfarbstofflösung erhält man bei Pferdeblut rhombische Nadeln ohne weitere Beimengungen, wenn man die Farbstofflösung bei — 20° in einer Kältemischung einfrieren läßt. Nach dem Auftauen hinterbleibt eine ziemlich große Menge abgesetzter Kristalle. Die Kristalle werden in wenig destilliertem Wasser gelöst und durch nochmaliges Ausfrieren umkristallisiert. Das Trocknen geschieht in der vorher beschriebenen Weise (siehe S. 189).

Bei dem leichter löslichen Schweinehämoglobin ist es nötig, die Farbstofflösung zunächst durch Eindunsten konzentrierter zu machen, und zwar zweckmäßig mittels eines über die Flüssigkeitsoberfläche geblasenen Luft- oder Gasstromes. Die Farbstofflösung wird bis zur Konsistenz eines dicken Sirup eingedunstet. Nach einigen Stunden setzten sich (auch ohne Gefrieren) bei Zimmertemperatur eine große Menge reiner Hämoglobinkristalle ab.

Die spektrophotometrische Untersuchung ergab, daß es sich um reines Oxyhämoglobin handelte.

E. Verfahren zur Herstellung mikroskopischer Dauerpräparate.

Ein Verfahren zur Herstellung mikroskopischer Dauerpräparate von Hämoglobinkristallen hat fußend auf früheren Angaben von *Stein*[2]) und von *Smreker* und *Zoth*[3]) neuerdings *Zoth*[4]) genauer

[1]) Nach dem Vorschlag von *Schuurmans-Stekhoven*. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 296 bis 297 (1901).

[2]) *St. v. Stein*: Ein Beitrag zur Lehre von den Blutkristallen. *Virchows* Arch. **97**. 483 (1884).

[3]) *E. Smreker* und *O. Zoth*: Über Darstellung von Hämoglobinkristallen mittels Kanadabalsam und einige verwandte Gewinnungsweisen. Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien. Math.-naturw. Klasse. III. Abt. **93**. 133 (1886).

[4]) *O. Zoth*: Herstellung mikroskopischer Dauerpräparate von Hämoglobinkristallen. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie. **32**. 139 bis 141 (1915).

beschrieben. Es eignen sich dazu vor allem die leicht kristallisierenden Blutarten, also Meerschweinchen, Eichhörnchen, Hund, Katze, Pferd. Zur Verwendung kommt defibriniertes Blut. Verwandelt man durch Darüberleiten von Kohlenoxyd (Leuchtgas) das Oxyhämoglobin in Kohlenoxydhämoglobin, so bekommt man ebenfalls sehr schöne haltbare Kristalle. Man fertigt sich aus zwei runden Deckgläschen (10 *mm* Durchmesser) eine Kammer, indem man unter Zwischenlegen eines Streifchens von dünnerem oder dickerem Schreibpapier die Gläschen an zwei gegenüberliegenden Stellen mit möglichst wenig Paraffin aneinander kittet und dann diese Kammer mit einem Tropfen Harzlösung auf die Mitte eines reinen Objektträgers kittet. Nach 24 Stunden kann diese Kammer verwendet werden.

Ein Tropfen defibrinierten Blutes wird mit einem ausgezogenen Glasröhrchen an dem offenen Rand der Blutkammer gesetzt. Der Tropfen dringt sofort ein und soll die Kammer gerade knapp füllen. Dann kommt auf das obere Deckglas der Blutkammer ein recht großer Tropfen Dammarharzlösung. Derselbe wird dann mit einem größeren runden Deckglas (16 *mm* Durchmesser), das man zweckmäßig mit einer Pinzette horizontal hält und vor seitlicher Verschiebung bewahrt, überdeckt, so daß er die Blutkammer von allen Seiten gleichmäßig umfließt.

Nach ein bis zwei Tagen beginnt die Kristallisation vom Rande aus; nach acht Tagen ist sie meist schon so weit vorgeschritten, daß die prächtigen glatten, scharfkantigen Kristalle auf völlig klarem, blaßgefärbtem Untergrunde schon mit freiem Auge zu sehen sind. Für die Beobachtung im Mikroskop ist schwache Vergrößerung und schiefe Beleuchtung zu empfehlen. Nach dem Erhärten des Harzes sind die Präparate auch zur Projektion mit dem Projektionsmikroskop (unter Schutz gegen zu starke Erhitzung) zu verwerten.

Ein schönes Demonstrationsobjekt für Hämoglobinkristalle aus Hundeblut, eventuell auch aus Menschenblut bietet gelegentlich der Inhalt der Hundezecken (Ixodes ricium), die auch den Menschen befallen können. Wenn sie sich mit Blut vollgesogen haben, besteht der Eingeweidesack aus einem Brei schöner Blutfarbstoffkristalle (*Grützner*)[1]).

F. Darstellung von Hämoglobin, Methämoglobin, Kohlenoxydhämoglobin usw.

Die Darstellung von Hämoglobin hat im allgemeinen nach den gleichen Regeln zu erfolgen wie die des Oxyhämoglobins. Im allgemeinen ist aber das Hämogloblin schwerer kristallisierbar als das Oxyhämoglobin. Es handelt sich zunächst darum, das auch im venösen Blut immer noch neben dem Hämoglobin vorhandene

[1]) *F. Grützner*: Über die Wirkung der Zecken auf tierischem Blut. Deutsche med. Wochenschr. **28**. 535 u. 556 (1902).

Oxyhämoglobin in das reduzierte Hämoglobin überzuführen. Man wird dabei die Erfahrungen benützen, die die Spektraluntersuchung bietet. Da es aber nur für ganz besondere Fragestellungen notwendig sein könnte, ein Präparat darzustellen, welches wirklich aus reinem Hämoglobin besteht, frei von Beimengungen von Oxyhämoglobin und anderen eiweißartigen Hämoglobinabkömmlingen, muß es von Fall zu Fall entschieden werden, wie man diesen Zweck erreicht. Es ist ja auch ausgeschlossen, daß man etwa nach dem *Hoppe-Seyler*schen Verfahren ein Oxyhämoglobinpräparat bekommt, in welchem ein wirklich einheitlich mit Sauerstoff gesättigtes Oxyhämoglobin vorliegt. Der Zweck dieser ganzen Reinigungsverfahren kann für die chemische Untersuchung doch wohl nur der sein, den Blutfarbstoff vom anderen eiweißartigen Stoffen des Blutes, insbesondere von den Plasmaeiweißkörpern, abzutrennen sowie von anderen Bestandteilen des Blutes, die überhaupt nicht eiweißartig sind.

Das gleiche gilt für die Darstellung von Kohlenoxydhämoglobin, Methämoglobin, Zyanhämoglobin usw. Es wird immer erst durch die bei der Spektraluntersuchung des Blutfarbstoffes genauer zu schildernden Methoden die möglichst vollständige Überführung des Hämoglobins in den betreffenden Farbstoff zu bewerkstelligen sein. Wenn dann das Bedürfnis sich herausstellen sollte, den betreffenden Stoff zu isolieren, so müßte ausgeprobt werden, welches der im vorstehenden beschriebenen Verfahren sich von Fall zu Fall am besten eignet.

Für das Methämoglobin sei nochmals ausdrücklich auf das beim Oxyhämoglobin beschriebene Ammoniumsulfatverfahren hingewiesen. Nach meinen Erfahrungen gelingt es aber nur sehr schwer, die Kristalle nach der Umwandlung in Methämoglobin wieder aufzulösen und durch Umkristallisieren weiter zu reinigen.

II. Farbstoffe im Blute niederer Tiere.

A. Eiweißartige Farbstoffe.

Eiweißartige Farbstoffe finden sich vielfach im Blut niederer Tiere. Am besten charakterisiert ist das Hämozyanin, das sowohl bei Mollusken als auch bei Krustazeen sich verhältnismäßig leicht darstellen läßt. Auch hier muß das Ziel eine kristallinische Darstellung sein. In manchen Fällen wird man sich aber auch damit begnügen müssen, wenn man nach den gleichen Reinigungsmethoden nur zu amorphen Präparaten kommt. Daß es sich um einen respiratorischen Farbstoff handelt, geht aus neueren Untersuchungen von *Dhéré*[1]) und *Botazzi*[2]) hervor.

[1]) *Ch. Dhéré*: Recherches sur l'hémocyanine. Arch. de Physiol. et Path. gén. **16**. 985 bis 997 (1916); **18**. 221 bis 243 (1919).

[2]) *J. Botazzi*: Recherches sur l'hémocyanine. Arch. de Physiol. et Path. gén. **18**. 1 bis 7 (1919).

I. Aussalzungsmethoden.

A. Darstellung von Hämozyanin aus Oktopusblut nach Henze[1]).

Das zentrifugierte Oktopusblut, durch Anschneiden der Hauptarterie gewonnen, wird mit so viel konzentrierter Ammoniumsulfatlösung versetzt, daß eben eine Trübung eintritt. Diese Trübung wird durch Wasserzusatz zur Lösung gebracht und dann mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure von neuem eine Trübung erzeugt. Nach halbtägigem Stehen hat sich ein Kristallbrei zu Boden gesetzt, der auf einem Seidenfilter gesammelt und mit einer Lösung von 7 Teilen Wasser und 3 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen wird. Die Kristalle sind gut ausgeprägt und zeigen schöne Doppelbrechung. Zur Analyse löst man in wenig Wasser, dialysiert bis zur Schwefelsäurefreiheit, und koaguliert durch Erwärmen. Beim Blut vom Helix pomatia (Weinbergschnecke) habe ich nach diesem Verfahren stets nur amorphe Niederschläge bekommen. Da anscheinend das Hämozyanin der einzige Eiweißkörper des Oktopusblutes ist, kann man sich für manche Zwecke mit der einfachen Hitzekoagulation des zentrifugierten Blutes begnügen (*Henze*).

Durch Fällen mit konzentrierter Magnesiumsulfatlösung hatte *Griffiths*[2]) aus Oktopusblut ebenfalls nur amorphes Hämozyanin erhalten.

B. Darstellung aus Krustazeenblut.

Bei einigen Krustazeen (Homarus, Maja) ist nach *Halliburton*[3]) ebenfalls Hämozyanin vorhanden. Die Darstellung wurde durch Magnesiumsulfatsättigung oder Kochsalzsättigung und langandauerndes Schütteln vorgenommen. Eine sichere Identifizierung mit dem Hämozyanin der Mollusken liegt nicht vor. Die damalige Methodik entspricht nicht den heutigen Anforderungen.

II. Darstellung von Hämozyamin durch Dialyse nach Dhéré.

Aus dem Blut verschiedener Krustazeen und Mollusken (Weinbergschnecke, Helix pomatia, Limax, Eledone, Krebs, Languste, Sepia u. a.) hat *Dhéré*[4]) mit verschiedenen Mitarbeitern durch

---

[1]) *M. Henze*: Zur Kenntnis des Hämozyanins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 370 bis 384 (1901); **43**. 290 (1904).

[2]) *A. B. Griffiths*: Über die Zusammensetzung des Hämozyanins. Compt. rend. Acad. des sciences. **114**. 496 (1892).

[3]) *W. D. Halliburton*: Über das Blut der dekapoden Crustaceen. Journ. of physiol. **6**. 300 (1895).

[4]) *Ch. Dhéré*: Sur la diversité des Hémocyanins suivant leur provenance coologique. Compt. rend. del'acad. **157**. 309 (1913); *Ch. Dhéré* et *A. Burdel*: Sur la cristallisation d'une Oxyhémocyanin d'Arthropode. Compt. rend. **158**. 978 bis 981 (1914); *Ch. Dhéré* et *A. Burdel*: Nouvelles Recherches sur la Cristallisation de Oxyhémoglobin d'Escargot. Compt. rend. Soc. Biol. **76**. 539 bis 564 (1914).

Dialyse das Hämozyanin zum Teil in Form von schönen Kristallen niedergeschlagen. Das Verfahren dürfte beim Blut niederer Tiere allgemeinerer Anwendung fähig sein.

Blut der Weinbergschnecke wird in Kollodiumschläuchen von mittlerer Durchlässigkeit acht bis neun Tage gegen zweimal täglich gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Es tritt dann ein reichlicher Niederschlag von dentritisch angeordneten Kristallen auf. Nach dem Dekantieren scheiden sich nunmehr aus der Mutterlauge von neuem allmählich wachsende wohlgeformte, doppelbrechende Kristalle aus, die bis zur makroskopischen Sichtbarkeit gelangen. Der Kristallbrei ist tiefblau. Die Mutterlauge entspricht in ihrer elektrischen Leitfähigkeit dem destillierten Wasser. Verwendung von Jenaer Glas ist notwendig, da schon das von gewöhnlichem Glas abgegebene Alkali genügt, um die Kristalle zu lösen. Man erhält also auf diese Weise Eiweißkristalle, die außerordentlich arm an beigemengten Elektrolyten sein müssen, während nach den meist angewandten Verfahren die Kristallisation unter Bedingungen erfolgt, bei denen reichliche Beimengungen von Salzen nicht vermeidbar sind.

Die Kristalle können mit destilliertem Wasser gewaschen werden, lösen sich leicht in wenig n/25-Sodalösung und scheiden sich nach Neutralisieren mit stark verdünnter Salzsäure, eventuell nach Dialyse, wieder als Kristalle aus.

Nach den gleichen Grundsätzen kann man allgemein das Blut niederer Tiere verarbeiten.

Bringt man einen Überschuß von durch Dialyse gewonnenen Kristallen von Hämozyanin der Weinbergschnecke in eine sehr verdünnte Natriumsulfatlösung (etwa n/1000), so lösen sich die Kristalle rasch. Nach 24 Stunden haben sich am Boden des Glases lange feine Nadeln frei von amorphen Beimengungen als reichliches Sediment abgeschieden. Die Kristalle sind in destilliertem Wasser unlöslich, leicht löslich in gleichem Volum n/50-Natriumkarbonatlösung.

Ein eigenartiges Verfahren führte bei der Languste zum Ziel, bei der das einfache Dialysationsverfahren nur zu amorphen Ausscheidungen führte.

Das Blut wird defibriniert, filtriert und bis zur Salzarmut dialysiert. Im elektrischen Feld wandert dann das Oxyhaemozyanin zur Anode und scheidet sich dort ab. Der Teil der Flüssigkeit mit dem Niederschlag wird herausgenommen und dann Kochsalzlösung bis zur Konzentration von zirka 1% hinzugegeben. Das Oxyhaemocyanin löst sich sofort, aber nach kurzer Zeit trübt sich die Flüssigkeit stark, es fällt ein reichlicher Niederschlag aus, der nach einigen Stunden ausschließlich aus Rhombododekaedern besteht. Die Kristalle werden mit destilliertem Wasser, in dem sie

unlöslich sind, fast salzfrei gewaschen, in wenig n/25-Sodalösung gelöst und dann mit stark verdünnter Salzsäure neutralisiert. Es erfolgt reichliche Umkristallisation.

Im Gegensatz zu diesem Verhalten des Oxyhaemozyanins der Languste in 1%iger Kochsalzlösung bleibt das Oxyhaemozyanin der Weinbergschnecke in 1%iger Kochsalzlösung monatelang völlig klar.

E. Philippi[1]) bestätigt die Angaben über die Darstellung von Hämozyanin nach dem Dialysationsverfahren für Sepia, Eledone, Helix. Bei Helix gelang es, Kristalle in größeren Mengen zu erhalten. Eine Schwierigkeit besteht in der außerordentlich leichten Löslichkeit in Elektrolyten. *Philippi* zieht den *Pregl*schen Dialysierapparat (Fermentforschung 1. 7 bis 19, 1914) dem käuflichen *Schleicher-Schüll*schen Dialysierhülsen vor. In einem Versuch mit solchen Dialysierhülsen erfolgte bei Dialyse im Eisschrank während drei Wochen keinerlei Kristallisation. Nach dieser Zeit begann, vom Boden des Gefäßes ausgehend, das dunkelblaue Blut sich zu entfärben (Autoreduktion!), ohne Fäulnisgeruch. Nach sechs Wochen schieden sich in geringem Maße prachtvoll ausgebildete rhombische Plättchen aus, die sich abzentrifugiert und, mit destilliertem Wasser gewaschen, in ganz verdünnter Ammoniumsulfatlösung sofort auflösten. *Philippi* vermutet, daß es sich um Hämozyanin handelte, während sonst bisher nur das Oxyhämozyanin vorgelegen hat.

Zur Gewinnung des Blutes von Helix pomatia gibt *Philippi* folgende Vorschrift, die mit Rücksicht auf die Verbreitung von Helix pomatia hier mitgeteilt sei.

Weinbergschnecken (am besten während der Befruchtungszeit, etwa im Mai) werden in einen Exsikkator gegeben, an dessen Boden sich etwas Äther befindet. Sie beginnen sofort lebhaft Schleim abzusondern, wodurch die spätere Gewinnung von reinem Blut sehr erleichtert wird. Nach etwa zehn Minuten befinden sich die Schnecken in einem Zustand tiefer Betäubung und fallen weit ausgestreckt zur Seite. Nun wird die Schale in der Herzgegend vorsichtig abgetragen und das Herz eröffnet.

Das Herz findet man, indem man die Schnecke so in die linke Hand nimmt, daß die Öffnung des Gehäuses vom Auge abgewandt ist. Dann wird die Schale in der Mitte zwischen den beiden Ansätzen der Öffnung, und zwar nach rechts hin in einer Ausdehnung von etwa 1 cm^2 vorsichtig mit einer kleinen Beißzange oder Schere abgetragen. Man sieht dann über der braunen Lebermasse ein flaches, gelblichweißes Organ, die Niere. Am rechten Rand der Niere sieht man das pulsierende Herz. Man öffnet mit einer feinen Schere den Eingeweidesack und hat nun das

[1]) *E. Philippi*: Über Hämozyanine. Z. f. physiol. Chem. **104**. 88 bis 94 (1919).

zweikammerige Herz frei vor sich, das man mit einem feinen Scherenschnitt eröffnet.

Auf den Schnitt reagieren die Tiere fast gar nicht, und es fließen zunächst nur wenige Tropfen Blut aus. Träufelt man nun einige Tropfen Äther auf Kopf und Fuß der Schnecke, so kontrahiert sie sich heftig und preßt den größten Teil des Blutes mit raschgehenden Plusschlägen aus. Man erhält bei großen Exemplaren mit einem Zeitaufwand von etwa zwei Minuten zirka 5 bis 6 cm^3 Blut. Um Verunreinigungen mit Schleim und Exkrementen zu vermeiden, kann man einen Streifen Filtrierpapier zwischen Fuß und Mantelrand schieben.

B. Nicht eiweißartige Farbstoffe des Blutes.

Außer den bisher beschriebenen eiweißartigen Farbstoffen kommen im Blute auch noch Farbstoffe vor, die anscheinend in die Gruppe der Lipochrome gehören, ferner gelegentlich Gallenfarbstoffe und Abkömmlinge derselben sowie bei niederen Tieren Chlorophyll und Derivate desselben. Diese Farbstoffe sind bisher kaum wirklich einigermaßen rein darstellbar. Die „Darstellung" beschränkt sich im allgemeinen darauf, daß durch Anwendung von Alkohol, Äther usw. die eiweißartigen Farbstoffe ausgeschlossen werden und daß dann alkoholische oder ätherische Lösungen spektroskopisch geprüft werden. Die Folge davon ist, daß die oft mit schönen Namen belegten Farbstoffe eigentlich ihrer Natur nach noch so gut wie unbekannt sind, daß es meist nicht einmal möglich ist, mit Sicherheit zu sagen, ob dem betreffenden Namen wirklich ein bestimmtes chemisches Individuum zugrunde liegt. Bei dieser Sachlage muß es einem Studium der Originalliteratur überlassen bleiben, Einblick zu finden in die Art, wie die betreffenden Versuche zur Isolierung angestellt wurden. Wenige Hinweise mögen hier genügen.

1. Echinochrom. Kann aus der Eingeweideflüssigkeit von Echinodermen gewonnen werden. Eröffnet man einen Seeigel (z. B. Sphärenchinus, Sphära), so fließt eine blaßrote Flüssigkeit ab, die bald gerinnt. Das Gerinnsel schrumpft zu einer braunroten Masse. Dem getrockneten Gerinnsel kann durch Wasser, Äther, Alkohol, Chloroform, Benzin, Schwefelkohlenstoff, Petroläther, Glyzerin der Farbstoff entzogen werden (*Mc Munn*[1]). Diese Lösungen zeigen spektrale Absorptionsbänder zwischen *D* und *E* sowie zwischen *B* und *F*. Die Lage ist aber sehr variabel. Ein Zusammenhang mit dem Hämatoporphyrin, wie ihn *Griffiths*[2]) annahm, müßte noch erwiesen werden.

[1]) *C. A. Mc Munn*: Über die Färbung des Blutes einiger Averterbraten. Quart. Journ. of mikroskop. Prience. **25**. 469 (1885).

[2]) *A. B. Griffiths*: Über Echinochrom, ein respiratorisches Pigment. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **115**. 419 (1892).



II. Chlorokruorin. Ein grüner Farbstoff, wie er sich im Blut mancher Anneliden vorfindet. *Griffiths*[1]) fällte das Blut von Sabella (einer Annelidenart) mit Alkohol; der Niederschlag wird in verdünnter Magnesiumsulfatlösung gelöst und dann durch Überschuß von Magnesiumsulfat wieder ausgesalzen und mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen. Dann wird in Wasser gelöst und auf 56° erwärmt. Dabei tritt Koagulation ein. Aus dem Filtrat läßt sich ein Farbstoff mit Alkohol ausfällen. Dieser Niederschlag wird als Chlorokruorin bezeichnet.

III. Als Hämerythrin bezeichnet *Griffiths*[2]) einen in den zelligen Elementen des „Blutes" einiger Würmer (Sipunkulusarten) enthaltenen roten Farbstoff. Er versuchte denselben in ähnlicher Weise darzustellen wie das Echinochrom.

IV. Tetronerythrin, ein roter Farbstoff, der im Blut höher organisierter Krustazeen sehr verbreitet ist. Es findet sich neben dem Hämozyanin, dessen Farbe es, wenn es reichlicher vorhanden ist, völlig verdecken kann. *Halliburton*[3]) stellte es aus Krabbenblut dar, indem er das Blut mit reichlich Alkohol vom Eiweiß befreite, filtrierte und das Filtrat eindampfte. Nach dem Verjagen des Alkohols scheidet sich das Tetronerythrin in roten Flocken ab, die durch Alkohol oder Äther wieder in Lösung gebracht werden können. Der Farbstoff ist in Benzol und Äther mit orangegelber, in Schwefelkohlenstoff und Chloroform mit rosenroter Farbe löslich. Es gehört demnach zu den Lipochromen.

---

[1]) *A. B. Griffiths*: Über die Zusammensetzung des Chlorokruorins. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **114**. 1277 (1872).

[2]) *A. B. Griffiths*: Das Hämerythrin, ein respiratorisches Pigment im Blut gewisser Würmer. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **115**. 669 (1892).

[3]) *W. D. Halliburton*: Journ. of Physiol. **6**. 300 (1885).

Die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes, ihr Nachweis und ihre Derivate.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Das Hämoglobin (Hb), der Farbstoff der roten Blutkörper der Wirbeltiere gehört zu den Proteiden, d. h. es enthält außer einem Eiweiß, Globin genannt, eine prosthetische Gruppe, die eisenhaltig ist. Im venösen Blut waltet das Hämoglobin als solches vor; es vermag Atmosphärsauerstoff (O_2) aufzunehmen und bildet dann das Oxyhämoglobin (Hb . . . O_2) des arteriellen Blutes. Es kann aber auch Oxydation erleiden, wodurch das Methämoglobin (Hb — OH) entsteht[1]). Alle drei Arten des Blutfarbstoffes sind kristallisiert erhalten worden. Jede Wirbeltierart dürfte ein besonderes Hämoglobin enthalten, was auf die Verschiedenheit der Eiweißkomponente zurückgeführt werden muß, da nach den bisher gewonnenen Resultaten die prosthetische Gruppe aller Blutarten sich als identisch erwiesen hat[2]). Die Addition des Sauerstoffmoleküls wie die anderer Gase[3]) und die Oxydation geschieht am Eisen, so daß im Hämoglobin die Ferrostufe anzunehmen ist, während das Methämoglobin dreiwertiges Eisen enthält und im Oxyhämoglobin eine bekanntlich leicht dissoziierende Additionsverbindung vorliegt. Man bezeichnet die Ferrostufe der prosthetischen Gruppe, die etwa 4% des Hämoglobinmoleküls ausmacht, als Hämochromogen[4]), die des Methämoglobins als Hämatin oder besser als Hydroxyhämin[5]).

H ä m o c h r o m o g e n. Die Abspaltung der prosthetischen Gruppe in der Form des Hämochromogens ist nur bei Abschluß des Luftsauerstoffes ausführbar. Zum mikroskopischen Nachweis[6])

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 232 (1910).

[2]) So hat *H. Fischer* gezeigt, daß das Blut von Karpfen das gleiche Hämin liefert wie Pferde- oder Ochsenblut. Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 180 (1914).

[3]) *G. v. Hüfner* und *W. Küster*: Arch. f. (Anat. u. Physiol.) Spl. 1904 '387.

[4]) *F. Hoppe-Seyler*: Med.-chem. Unterricht. H. 4. 544 (1871); Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 477 (1889).

[5]) *W. Küster*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **53**. 627 (1920).

[6]) *Z. Donogany*: *Malys* Jahresb. f. d. Fortschr. d. Tierchemie. **23**. 126 (1894); *H. U. Kobert*: Das Wirbeltierblut in mikrokristallographischer Hinsicht. *F. Enke*, Stuttgart; *K. Bürker*: Münch. med. Wochenschr. 1909, 126.

des Hämochromogens mischt man unter dem Deckglase einen Tropfen defibrinierten Blutes mit je einem Tropfen Pyridin und Schwefelammonium. Es erscheinen dann sehr rasch die rot gefärbten, meist büschelförmig angeordneten Nädelchen des Hämochromogens; wenigstens weisen diese Kristalle, mit dem Mikrospektroskop betrachtet, das Spektrum des Hämochromogens auf, wie man es auch erhält, wenn eine alkalische Hämatinlösung mit Hydrazin oder einer Kaliumsulfhydratlösung versetzt wird. Es ist ausgezeichnet durch zwei Bänder: ein dunkler, scharf begrenzter Streifen zwischen *D* und *E* auf λ 559·1, ein schwächerer, etwas breiterer Streifen um *E* herum auf λ 529·2[1]). Rot, Grün und ein Teil des Blau wird schwach, der andere Teil des Blau bis Violett stark absorbiert. Größere Mengen von Hämochromogen kann man nach einem von *R. v. Zeynek*[2]) ausgearbeitetem Verfahren in Form des Ammonsalzes darstellen, das in seiner Zusammensetzung der Formel $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe \cdot NH_3$ entspricht.

Zeynek[3]) gewann dann auch ein Hämatin aus einer 5%igen wässerigen Lösung von Oxyhämoglobin aus Pferdeblut, die 0·2 bis 0·3% Salzsäure enthielt, durch Einwirkung von Pepsin, gelöst in 0·4%iger Salzsäure, das sich durch Aufschwemmen in Azeton und Zusatz von Salzsäure wenigstens zu einem großen Teil in „Hämin" überführen ließ, wodurch der Nachweis erbracht ist, daß sich dieses Verdauungshämatin zum Hämin wie die Base zum Salz verhält, was auch in den für beide Stoffe gebräuchlichen Formeln:

$$C_{34}H_{32}O_4N_4Fe\,OH \text{ und } C_{34}H_{32}O_4N_4Fe\,Cl$$

zum Ausdruck kommt[4]). Gewöhnlich wird das Hämin oder genauer das Chlorhämin, denn es können auch andere Halogene an Stelle des Chlors treten, direkt aus dem Blut gewonnen, und diese Möglichkeit wird einerseits zum Nachweis von Blut benützt, andererseits zur präparativen Herstellung von Hämin herangezogen.

Man zerreibt die zu untersuchende Substanzprobe, z. B. den eingetrockneten wässerigen Auszug aus einem Flecken auf einem Kleidungsstück, mit einem Körnchen Kochsalz, läßt einen Tropfen Eisessig auf das Pulver fallen, bedeckt, noch ehe der Eisessig zerfließt, mit einem Deckglase, füllt unter dem letzteren mit Eisessig auf und erhitzt den Objektträger bis zum schwachen Sieden des Eisessigs. Unter dem Mikroskop beobachtet man alsdann die charakteristischen „*Teichmann*schen Häminkristalle", dunkelbraune Prismen, die häufig gekrümmt auftreten, falls Blut vorhanden war.

---

[1]) *J. Formanek*: Zeitschr. f. analyt. Chem. **40**. 505 (1901).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**. 492 (1898).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 126 (1900).

[4]) Es sei erwähnt, daß *Willstätter* für beide Stoffe Formeln mit C_{33} bevorzugt.

Darstellung von Rohhämin.

Zur Darstellung von rohem Hämin dienen die Methoden von *Mörner*[1]) und von *Schalfejeff*[2]). Die erstere wurde schon von *Hoppe-Seyler*[3]) angewendet und beruht darauf, daß nach Zerlegung des Hämoglobins die eisenhaltige Komponente durch schwefelsäurehaltigen Alkohol als Sulfat in Lösung gebracht und vom Globin durch Filtration getrennt werden kann, worauf sie durch Salzsäure als Hämin gefällt wird, das also in bezug auf das Chlor ein Kunstprodukt ist. Bei der Methode von *Schalfejeff* wird das Globin durch Eisessig in lösliche Substanzen überführt, während das Hämin zurückbleibt. Es wird zweckmäßig als α-Hämin von dem nach der *Mörner*schen Methode hergestellten, das als β-Hämin bezeichnet wird, unterschieden[4]).

A. Die *Mörner*sche Methode gestattet bei kleinem Laboratoriumsbetrieb die tägliche Verarbeitung von 15 *l* defibrinierten Blutes; sie kann auch auf Blutkörper und auf kristallisiertes Hämoglobin angewendet werden[5]). Man bringt in einem Kupferkessel von zirka 25 *l* Inhalt ein Gemisch von 5 *l* Ochsenblut und 15 *l* Wasser nach Zusatz von 50 cm^3 1%iger Schwefelsäure durch Holzfeuerung unter stetem Umrühren bis zum lebhaften Aufwallen und überträgt das erhaltene Koagulum in Drillsäcke von 50 *cm* Länge und 35 *cm* Durchmesser, die fest aufgespannt worden sind. Sobald die Flüssigkeit abgelaufen ist, folgt ein Abpressen (hiezu eignet sich eine große Fruchtpresse von 45 *cm* Durchmesser), worauf der Preßkuchen noch warm mit einem Spatel zerkleinert und das Pulver mit 2 bis 3 *l* 90%igem Alkohol angerieben wird. Jetzt wird ein drittes Mal abgepreßt, der Preßkuchen gewogen und mit einer Alexanderwerk-Reibmaschine zerkleinert. Das Pulver wird nun auf fünf Porzellanschalen verteilt; in jede derselben werden etwa 500 *g* kommen, da das Gewicht des Kuchens zwischen 2·2 bis 2·8 *kg* schwanken wird, und jede mit 1750 cm^3 90%igen Alkohols beschickt, dazu kommen dann unter Umrühren je 17·5 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure, mit welchem Gemisch nunmehr die Masse zwei Stunden in einem kühlen Raum digeriert wird. Inzwischen sind fünf Trichter von zirka 35 *cm* Durchmesser, in die man zweckmäßig kleinere von 12 *cm* Durchmesser einsetzt, mit entsprechenden Filtern (es eignet sich z. B. Nr. 281 von *Dreverhoff*) beschickt worden, in welche die Masse nun gebracht wird. Sobald die dunkelrote

[1]) Nordiskt Med. Arch. Festband Nr. 1. Nr. 26. 1 (1896).

[2]) Le Physiologiste russe. **1**. 15. Moscau 1898; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**c. 232 (1885).

[3]) Med.-chem. Untersuchungen. S. 523.

[4]) *W. Küster* und *K. Reihling*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 120 (1914).

[5]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 187 Anm. (1900).

Flüssigkeit völlig abgetropft ist, werden die Filter samt ihrem Inhalt wieder in einen Drillsack (von gleichen Dimensionen wie oben angegeben) gebracht und in der gereinigten Presse vollständig ausgepreßt. Die Filtrate und Preßsäfte werden gemessen, in einem Ballon gemischt und die 1 *l* Blut entsprechende Menge des alkoholischen Extraktes in einem im Wasserbade liegenden Rundkolben gerade bis zum Sieden gebracht, worauf ein Gemisch von 8 cm^3 25%iger Salzsäure und 12 cm^3 90%igen Alkohols unter Umschütteln zugefügt wird. Hiebei tritt starkes Aufschäumen ein; man wähle also den Rundkolben entsprechend groß. Jetzt wird die Flüssigkeit sofort in ein Becherglas abgegossen und der Inhalt durch Einstellen in kaltes Wasser gekühlt, worauf man zwei Tage ruhig stehen läßt, damit sich das Hämin möglichst vollständig zu Boden setzt, so daß der überstehende Alkohol klar abgegossen werden kann[1]). Der Bodensatz wird dann auf ein Filter gebracht, nach Ablauf der weinrot gefärbten Mutterlauge mit zirka 50%igem Alkohol, der 1% Salzsäure enthält, nachgewaschen und die Kristallmasse schließlich auf Filtrierpapier zunächst an der Luft, dann im Vakuum oder bei mäßiger Wärme (70°) getrocknet. Das Präparat wird nun zerrieben, in eine Extraktionshülse gebracht und mit Petroläther vom anhängenden Cholesterin befreit.

Die Ausbeute wechselt; im Durchschnitt beträgt sie 3·5 *g* Hämin pro Liter Blut. Sie dürfte sich nach dem verschiedenen Gehalt des verwendeten Blutes an Hämoglobin richten, ist also um so besser, je kräftiger die Tiere waren, deren Blut zur Verarbeitung kam. Daher kommt es dann auch, daß die Ausbeuten bei Verwendung von Rinderblut gewöhnlich diejenigen übertreffen, die man aus Pferdeblut erhält. In diesem Falle tut man übrigens gut, nur den nach 24 Stunden abgesetzten Blutkörperbrei zur Herstellung des Hämins zu benützen, da man hiedurch erheblich an Alkohol sparen kann, die leichte Fäulnis des Blutes aber für die Methode *Mörner*s nicht von Belang ist. Man erhält dann nämlich im Durchschnitt pro Liter Blutkörper 520 *g* Blutkuchen, verwendet zu dessen Extraktion zweckmäßig 2 *l* 90%igen Alkohols und erhält — wieder im Durchschnitt — 4·8 *g* Hämin[2]).

Natürlich kann man, falls eine Zentrifuge zur Verfügung steht, auch die ausgeschleuderten und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Rinderblutkörper verwenden, eine Modifikation, die ein sehr reines Hämin liefert. An Stelle von Äthylalkohol kann auch 90%iger Methylalkohol in gleichen Mengen, an Stelle der Salzsäure

[1]) Der vom ausgeschiedenen Hämin abgegossene Alkohol sowie die erste Mutterlauge wird über Kalk abdestilliert, wonach er gewöhnlich 85-volumprozentig ist; er kann für das Verfahren von neuem, mit stärkerem Alkohol zu 90% gemischt, verwendet werden.

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**. 402 (1904).



auch mit Bromkalium gesättigte 25%ige Bromwasserstoffsäure, und zwar 27 *cm*³ pro Liter Blut verwendet werden. Man erhält alsdann ein Gemisch von Chlor- (bezw. Brom-) hämin mit Methylestern desselben, wie denn auch das mit Hilfe von Aethylalkohol dargestellte β-Chlorhämin etwa 1% Äthyl zu enthalten pflegt. Eine Verseifung dieser Beimengung an Aethylester des β-Hämins kann durch Kochen mit einer Mischung von Methyläthylketon und verdünnter Salzsäure erreicht werden; auf 1 *g* Hämin nimmt man 50 *cm*³ des Ketons und 10 *cm*³ 10%iger Salzsäure und erhitzt zwei bis drei Stunden am Rückflußkühler[1]). Für die Gewinnung von Hämato- oder Mesoporphyrin oder für den reduktiven bezw. oxydativen Abbau ist diese Verseifung nicht nötig.

Das bei Verwendung von Methylalkohol erhaltene Gemisch, welches zum größten Teil aus dem Monomethylester des β-Hämins besteht, eignet sich allein zur Gewinnung des Dimethyl(chlor)-hämins. Übrigens schwanken hier die Ausbeuten beträchtlich (2·6 bis 4·6 *g* Hämin pro Liter Blut wurden erhalten), und es wurde beobachtet, daß gerade das Blut sehr kräftiger Tiere schlechtere Ausbeuten, allerdings aber auch immer ein sehr schönes Präparat liefert[2]). Für die Anlagerung von Brom an Hämin sowie für die Herstellung von Hämatoporphyrin und dessen Methylderivaten eignet sich das mit Hilfe von Bromwasserstoff gewinnbare Bromhämin.

An Stelle der Alkohole kann endlich nach einem von *Zaleski* und *Merunowicz*[3]) ausgearbeiteten Verfahren auch Azeton zum Herauslösen der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes benützt werden.

Die Darstellung von Azetonhämin gestaltet sich danach wie folgt: Das wie bei der Arbeitsweise von *Mörner* erhaltene Blutkoagulum wird auf Fließpapier so lange getrocknet, bis der Rückstand aus 1 *l* Blut 300 bis 350 *g* wiegt. Dann werden Portionen von 150 bis 200 *g* in Porzellanschalen abgewogen, auf Wasserbädern etwas erwärmt und das warme Pulver mit 250 bis 300 *cm*³ Azeton, dem 12 bis 16 *cm*³ 50%ige Schwefelsäure zugefügt worden sind, eine Minute digeriert, worauf zuerst durch ein Leinsäckchen, dann durch Fließpapier filtriert und der Rückstand ausgepreßt wird. Die Filtrate und Preßsäfte werden gemischt, auf 40 bis 45° erwärmt und pro Liter Blut mit 30 bis 40 *cm*³ Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·12) versetzt, worauf sich rasch Kristalle

[1]) Durch stärkere Salzsäure wird das Hämin verändert, und zwar wird es in Alkalien unlöslich und es verliert auch Halogen. Auch eignen sich nur die aus Ochsenblut dargestellten Hämine für die Verseifung, die aus Pferdeblut gewonnen, verändern sich viel schneller.

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 115 (1912).

[3]) Bull. de l'acad. des sciences de Cracovie. Juli 1907. S. 634.

abscheiden, deren Menge beim Erkalten der Lösung zunimmt. Sie erscheinen zunächst in dünnen Nadeln mit stark ausgeprägtem Dichroismus; nach längerem Stehen der Lösung treten aber am zweiten bis dritten Tage *Teichmann*sche Kristalle und Nadeln auf, daneben sind noch geringe Mengen von Verunreinigungen, hauptsächlich von Lezithinen, zu sehen, welche an ihren typischen Interferenzfiguren zu erkennen sind. Nach dem Abfiltrieren werden die Kristalle mit 50%igem Azeton, das 0·001% Salzsäure enthält, ausgewaschen, im Vakuum getrocknet und darauf mit Petroläther extrahiert. Beim Trocknen bei 110° verlieren diese Kristalle Azeton.

Das Azetonhämin unterscheidet sich also in der Kristallgestalt von den mit Hilfe von Alkoholen hergestellten Häminen, da das β-Chlorhämin in kleinen, nicht gestreckten Nadeln oder Spindeln, das β-Bromhämin in würfelähnlichen Formen zu kristallisieren pflegt. Auch in den Löslichkeitsverhältnissen bestehen Unterschiede, indem das Azetonhämin sich in Azeton, Chloroform und Alkohol verhältnismäßig leichter löst als β-Hämine, die von den alkylierten Beimengungen, welche sich z. B. in Chloroform leicht lösen, befreit worden sind.

Darstellung von α-Hämin.

B. Die Methode von *Schalfejeff*, in der Modifikation von *Nencki-Zaleski*[1]) ist nur auf frisches Blut anwendbar, d. h. das defibrinierte Blut eines am Vormittage geschlachteten Tieres muß spätestens am Nachmittage verarbeitet werden; Pferdeblut eignet sich weniger gut als Ochsenblut. Man arbeitet am besten in einem offenen Raum.

In einem Rundkolben von 4 *l* Inhalt werden 3 *l* Eisessig von 99 bis 100 % unter Zusatz von etwas Chlornatrium im Dampfbade auf 95° erhitzt, worauf 1 *l* defibriniertes und durch dünne Gaze filtriertes Blut unter Umschwenken in zwei Portionen, und zwar durch einen Tropftrichter eingetragen wird, dessen Ablaßrohr nahe über dem Eisessig endet und die Gefäßwand nicht berührt. Nach Zusatz eines halben Liters Blut wird die Temperatur erst wieder auf 95° gebracht und dann der Rest einlaufen gelassen, worauf noch eine viertel Stunde erwärmt wird. Sobald der ganze Inhalt des Kolbens von den atlasglänzenden Häminkristallen erfüllt erscheint, gießt man durch ein Koliertuch in eine große Porzellanschale und läßt über Nacht stehen. Nun wird die stark gefärbte Flüssigkeit von dem am Boden sitzenden Hämin abgegossen und das letztere mit 1%iger Salzsäure auf Filter gespritzt; nach dem Auswaschen wird es auf Fließpapier getrocknet. Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 4·5 *g* Hämin pro Liter Blut.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 390 (1900).

Auf diese Weise hat *R. Willstätter*[1]) 25 *l* Blut am Tage verarbeiten lassen. Als sehr zweckmäßig empfiehlt er die Verwendung von Blutkörpern, die mit Hilfe einer Jouanzentrifuge von *Leune* in Paris erhalten und direkt verarbeitet werden. Er erzielt hiedurch bei Verwendung von nur 1 *l* Eisessig auf 1 *l* Blut um 10 bis 25% bessere Ausbeuten an Hämin in so reiner Form, daß ein Umkristallisieren nicht erforderlich ist[2]).

Reinigung des Rohhämins.

Die nach den beschriebenen Methoden erhaltenen Präparate von Hämin enthalten gewöhnlich Verunreinigungen, z. B. von Eiweiß. Zur Entfernung derselben muß das rohe Hämin in Lösung gebracht werden, was zwar durch organische Basen, wie z. B. Pyridin, und durch alkoholisches Ammoniak gelingt, welche Reaktion aber mit einer chemischen Umsetzung verknüpft ist, auf die bei der Darstellung des De(hydrochlorid)hämins näher eingegangen werden wird. Man kann daher nicht von einer Umkristallisation sprechen, sondern bezeichnet den Vorgang als

Umscheidung des Hämins.

Dieselbe gelingt unter Zuhilfenahme von Eisessig bei den aus Ochsenblut hergestellten α-Hämin und dem Azetonhämin, auch β-Hämine, die mit Hilfe von Äthylalkohol und Salzsäure gewonnen worden sind und wenig Alkyl (bis 1% C_2H_5) enthalten, lassen sich nach dieser Essigsäuremethode umscheiden. Man nimmt höchstens 5 *g* möglichst frisch dargestelltes Rohhämin auf einmal in Arbeit und bringt je 1 *g* desselben durch kräftiges Schütteln von fünf Minuten Dauer mit einer Lösung von 1 *g* Chinin in 25 cm^3 Chloroform in Lösung, dann filtriert man durch ein Kreppfilter (*Dreverhoff*) und wäscht mit wenig Chloroform nach. Das erhaltene Filtrat wird in je 140 cm^3 mit Kochsalz gesättigten Eisessigs, der während des Lösens des Farbstoffes auf 105 bis 110° erhitzt worden ist, unter beständigem Rühren eingetragen, wobei das Chloroform teilweise verdampft. Noch während des Erkaltens erscheinen dann die ersten Häminkristalle, deren Abscheidung dadurch, daß man die Wandungen des Becherglases mit dem Glasstabe etwas rauh macht, befördert wird. Zur Vollendung der Ausscheidung läßt man einen Tag bei kühler Außentemperatur stehen, saugt dann ab und verdrängt die Mutterlauge[3]) zuerst mit konzentrierter,

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **385**. 197 (1911).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 457 (1913).

[3]) Sie kann nach Vertreibung des Chloroforms noch ein zweites Mal zur Umscheidung von Rohhämin benützt werden; die in ihr gelöst bleibenden Anteile des Farbstoffes lassen sich nach Abdestillation der Essigsäure wiedergewinnen und können z. B. für die Darstellung von Hämatinsäure noch verwendet werden.

dann mit verdünnter Essigsäure, die etwas Salzsäure enthält. Die Kristalle werden zunächst auf Fließpapier, dann im Vakuum neben Kaliumhydroxyd getrocknet. Ausbeute 0·6 bis 0·8 *g* aus 1 *g* Rohhämin. Statt Chinin kann auch Pyridin[1]) verwendet werden, von dem auf 1 *g* Farbstoff etwa 3 cm^3 ausreichen; dazu kommen 5 cm^3 Chloroform und die gleiche Menge zum Nachspülen; der Eisessig wird kurz vor dem Eintragen der Farbstofflösung mit zirka 1 cm^3 konzentrierter Salzsäure vermischt.

Trägt man die Farbstofflösung in Eisessig ein, der Bromwasserstoffsäure statt Salzsäure enthält, so bildet sich unter Verdrängung des Chlors durch Brom α-Bromhämin. Doch ist es besser, gleich ein rohes Bromhämin zu verwenden, d. h. bei der Verarbeitung des Blutes dem Eisessig Bromkalium zuzufügen, da die Verdrängung des Chlors durch Brom bei der einmaligen Behandlung nicht vollständig werden kann[2]).

Ebensogut wie das α-Hämin aus Ochsenblut läßt sich auch das rohe Azetonhämin umscheiden. Man löst bei Z. T. 1 *g* in 75 cm^3 eines 80%igen Azetons auf, das 2% Ammoniak enthält, filtriert die Lösung und trägt das Filtrat in 300 cm^3 Eisessig-Chlornatrium bei 105° ein, worauf fast augenblicklich die Kristallisation in *Teichmann*schen Kristallen erfolgt.

E i g e n s c h a f t e n d e s α-H ä m i n s. Der prozentischen Zusammensetzung entspricht die Formel $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$; sie repräsentiert auch das Molekulargewicht[3]). Das Hämin bildet dünne Blättchen und Säulen des triklinischen Systems, die größten von ihnen sind 0·2 *mm* lang und 0·05 *mm* breit, der Habitus der Kristalle und ihrer sternähnlichen Durchkreuzungszwillinge erinnert an die Gipsgestalten. Im auffallenden Licht erscheinen sie schwach metallisch glänzend, im durchgehenden Licht dunkelbraun und wenig durchsichtig. Das α-Bromhämin gleicht äußerlich der Chlorverbindung, die Kristalle sind aber bedeutend größer, bis 2 *mm* lang[4]).

Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintert das Hämin gegen 240° und schmilzt selbst bei 300° nicht.

Das Hämin besitzt saure Eigenschaften, und zwar ist es als eine Dikarbonsäure aufzufassen, da zwei Wasserstoffatome durch Alkyle vertretbar sind[5]) und die so entstehenden Derivate Estercharakter haben, also z. B. leicht verseifbar sind. Die vier Sauer-

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **40.** 394 (1904).

[2]) *W. Küster* und *K. Reihling*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91.** 125 (1914).

[3]) *H. Fischer* und *A. Hahn*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46.** 2308 (1913).

[4]) *J. Merunowicz* und *J. Zaleski*: Bull. de l'Acad. des sciences de Cracovie. Juli 1907. S. 641.

[5]) *M. Nencki* und *J. Zaleski*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **30.** 390 (1900).

stoffatome des Häminmoleküls gehören also zwei Karboxylen zu. Hämin löst sich auch in verdünnten Alkalien sowie in neutralen Karbonaten der Alkalimetalle, aber ohne Kohlensäureentwicklung auf, ist aber in sauren Karbonaten sowie in zweifach sauren Phosphaten unlöslich.

Eine 0·1%ige Lösung von Dinatriumphosphat löst nur in der Wärme auf, und auch eine 0·5%ige verhält sich nicht wesentlich verschieden. Wenn sich Hämin aber in Alkalien auflöst, so wird auch das Chlor des Moleküls wenigstens zum größten Teil eliminiert, und es bildet sich das Hämatin, so daß auf ein Molekül des Farbstoffes drei Moleküle eines Alkalis erforderlich sind.

Unterwirft man die Lösung eines neutralen Alkalisalzes, des Hämatins, der Dialyse, so tritt ein Molekül Alkali in das Außenwasser, welche Beobachtung zusammen mit der Tatsache, daß sich nur ein saurer Methylester des Hämins leicht bildet, dafür spricht, daß die beiden Karboxyle nicht gleichwertig sind, was in der Gesamtkonfiguration des Moleküls begründet sein muß[1]).

Mit verdünnten Säuren bildet das Hämin keine Salze, mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure entsteht ein Di- und ein Tribromhydrat[2]).

Das Dihydrobromid des Bromhämins.

5 *g* fein gepulvertes Hämin werden in einer Stöpselflasche mit 200 *g* 66%iger Bromwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·78) eine Stunde lang geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Die Säure ist dann intensiv blaurot gefärbt, da etwa ein Drittel des Hämins unter Verlust des Eisens in Lösung gegangen ist, der Rest hat sich in schöne glitzernde Kristalle verwandelt, die nach Verdünnung mit Eisessig abgesaugt werden können, worauf mit Eisessig und mit Wasser gewaschen, schließlich im Exsikkator neben Kaliumhydroxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. Ausbeute 3·5 *g*. Zusammensetzung: $C_{34}H_{32}O_4N_4FeBr \cdot 2\,HBr$ [3]).

Das Dihydrobromid kristallisiert sehr ähnlich dem Hämin in großen, schief abgeschnittenen Prismen, die lebhaften Glanz und schwarzblaue Farbe zeigen und deren Pulver dunkelblau ist, schöner blau als das vom Hämin. Im Gegensatz zu letzterem ist

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 191 (1910).

[2]) *R. Willstätter* und *M. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 443 (1913).

[3]) *Willstätter* gibt dem Hämin und seinen Derivaten Formeln mit 33 Kohlenstoffatomen; da aber Bedenken gegen diese Formulierung bestehen und von allen anderen auf dem Hämingebiete tätigen Forschern die Formel mit 34 Kohlenstoffatomen bevorzugt wird, glaubte ich der Einheitlichkeit halber die Abänderung vornehmen zu dürfen. *W. Küster.*

das Additionsprodukt in Äther leicht löslich, namentlich beim Schütteln mit Äther und etwas Wasser oder sehr verdünnter Säure. Auch in Alkohol löst es sich sehr leicht mit intensiv rotbrauner Farbe, in welcher Lösung rasch Esterbildung eintritt. In Eisessig lösen sich die Kristalle reichlich, aber langsam. Charakteristisch gefärbt, nämlich schön blaurot, ist die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure, während sich Hämin weit langsamer und mit grünlich braunroter Farbe in dieser Säure löst.

Das Dihydrobromid verliert im Vakuum der Gaedepumpe bei 105° zwei Moleküle Bromwasserstoff, wonach ein dem Hämin wieder sehr ähnlicher Stoff zurückbleibt, der in allen Solventien schwer löslich ist und konzentrierte Schwefelsäure rot anfärbt. Es handelt sich aber nicht mehr um intaktes Hämin, da sich das Produkt nicht mehr klar in Pyridin löst und sich nach der Essigsäuremethode nicht mehr umkristallisieren läßt.

Nach allen Eigenschaften kann dieses Dihydrobromid des Hämins als ein Salz der zweisäurigen Base „Hämin" mit Bromwasserstoffsäure aufgefaßt werden.

Ein Tribromhydrat des Hämins $C_{34}H_{32}O_4N_4FeBr\,3\,HBr$ bildet sich bei längerer Einwirkung eines mit Bromwasserstoff gesättigten Eisessigs vom spezifischen Gewicht 1·4 (bei 0° bestimmt) auf Hämin, wobei aber fast die Hälfte des Farbstoffes bereits das Eisen verliert. Es stellt ein braunrotes Pulver vor, unter dem Mikroskop betrachtet aus korrodierten häminähnlichen Kristallen bestehend, das in Äther unlöslich ist. Im Hochvakuum verliert es bei 105° etwas mehr als ein Molekül Bromwasserstoff.

Durch konzentrierte Schwefelsäure wird das Hämin unter Entwicklung von Chlorwasserstoff gelöst, wobei auch das Eisen zum größten Teil entfernt wird, so daß es zur Porphyrinbildung kommt[1]).

Organische Solventien, abgesehen von solchen mit basischem Charakter (Anilin, Pyridin), lösen das α-Hämin nur in äußerst geringer Menge; auch mit verdünnter Schwefelsäure angesäuerter Alkohol löst nur Spuren auf.

Zur Darstellung von „Hämatin" werden 5 *g* reines Hämin mit ein wenig Alkohol in einer Schale angerieben und mit einer Auflösung von 1 *g* Natriumhydroxyd in 500 cm^3 kaltem Wasser in eine Flasche übergespült, in der dann die vollständige Lösung des Farbstoffes durch kurzes Schütteln erreicht wird. Man filtriert durch ein Kreppfilter in einen hohen Literzylinder, wäscht mit

[1]) Vgl. *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 173 (1910).

kaltem Wasser nach, fügt 100 *cm*³ einer einvolumprozentigen Schwefelsäure hinzu, schüttelt um, läßt das gefällte Hämatin absitzen und decantiert zweimal mit kaltem Wasser. Nun wird nochmals in reiner Natronlauge gelöst — es genügen jetzt 0·67 *g* Na OH — und wieder mit Schwefelsäure gefällt. Es geschieht dies, um die Herausnahme des Chlors möglichst vollständig zu machen. Der durch öfteres Decantieren gereinigte, sehr voluminöse Hämatinschlamm wird schließlich auf ein gehärtetes Filter (*Dreverhoff* Nr. 495) gebracht und mit kaltem Wasser $SO_4^{\cdot\cdot}$ frei gewaschen, dann abgesaugt, zunächst auf Fließpapier, dann im Vakuum oder bei gelinder Wärme getrocknet. Die Zusammensetzung des Hämatins läßt sich durch die Formel $C_{34}\,H_{32}\,O_4\,N_4\,Fe\,OH$ wiedergeben; es ist amorph, dürfte also ein Gemenge vorstellen, das dunkelstahlblaue, metallisch glänzende Stücke bildet, die sich zu einem fast schwarzen, spezifisch schweren Pulver zerreiben lassen. Die Lösung in einem verdünnten Alkali sieht braungrün aus und zeigt im Spektrum ein breites, mattes Band zwischen *C* und *D*. Der Reduktion zum Hämochromogen ist schon gedacht worden.

Im Gegensatz zum Hämin löst sich Hämatin in Alkohol auf, der ein paar Tropfen verdünnter Schwefelsäure enthält. Erhitzt man diese Lösung zum Sieden und fügt wie bei der Herstellung von β-Hämin Salzsäure hinzu, so fällt ein „Hämin„ aus, das bei Verwendung von Methylalkohol dimethyliert ist, aber den richtigen Chlorgehalt nicht aufweist, auch beim Auswaschen Chlorionen abgibt und sich schließlich in mit Schwefelsäure angesäuertem Alkohol wieder auflöst. Es kann sich also nicht um ein echtes Hämin handeln, sondern um ein Pseudohämin, bei welchem die Salzbildung nicht wie bei jenem vorwiegend am Eisen, sondern vorwiegend am (basischem) Stickstoff erfolgt ist.

Der Grund für das Abweichen des Verhaltens der Hämatinmodifikation, welche aus Hämin durch Einwirkung von Natronlauge erhalten wird, gegenüber dem Hämatin, das aus dem Hämoglobin bei Luftzutritt oder aus dem Methämoglobin abspaltbar ist und bei dem *Mörner*schen Verfahren, also unter denselben Bedingungen, bei deren Einhaltung das mit Hilfe von Natronlauge hergestellte Hämatin ein dimethyliertes Pseudohämin liefert, ein monomethyliertes echtes β-Hämin gibt, kann mit Sicherheit nicht angegeben werden. Vielleicht bewirkt die Lauge eine intramolekulare Umlagerung, vielleicht gesellt sich noch eine Polymerisation hinzu[1]). Es gelingt auch nicht, das mit Hilfe von Natronlauge hergestellte

[1]) Vgl. hierzu *W. Küster*: Über die Bindung des Eisens in der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes und die Konstitution derselben. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **93**. 110. (1920).

Hämatin nach der Essigsäuremethode in α-Hämin zu verwandeln[1]), während das Verdauungshämatin *Zeyneks*, wie erwähnt, schon durch Berührung mit Salzsäure Hämin gibt, dagegen liefert ein Reduktionsprodukt des Hämatins, das Mesohämatin, nach der Essigsäuremethode Mesohämin (vgl. S. 220), und so dürften die ungesättigten Stellen im Hämin, die im Mesohämin reduziert sind, einen Einfluß auf die „Pseudohäminbildung" ausüben.

Nun gibt es ein Isomeres des Hämatins, das allerdings noch nicht im reinen Zustande erhalten worden ist, auf dessen Existenz aber die Analysen der Stoffe schließen lassen, die bei der Einwirkung von Anilin auf α- oder β-Hämin entstehen. Diese Base wirkt danach in zweierlei Richtung; einmal wird das Chlor durch Hydroxyl ersetzt unter Bildung des dem Hämatin isomeren Hydroxyhämins und dann entstehen unter Abspaltung von Halogenwasserstoff Stoffe von der Zusammensetzung $C_{34} H_{31} O_4 N_4 Fe$, und zwar kommt es bei der Einwirkung von Anilin auf α-Hämin aus Ochsenblut hauptsächlich zur Bildung eines solchen De-(hydrochlorid)hämins, während aus α-Bromhämin ein etwa äquimolekulares Gemenge von De-(hydrobromid) und Hydroxyhämin zu entstehen pflegt. Während sich nun das α-De-(hydrochlorid)hämin und das Hydroxyhämin nach der Essigsäuremethode wieder in α-Hämin verwandeln lassen, versagt diese Methode des öfteren bei den Produkten, welche bei der Einwirkung von Anilin auf α-Bromhämin entstehen.

Einen Einblick in diese verwickelten Verhältnisse gestattet ein Befund bei dem β-Monomethylchlorhämin[2]). Es gibt, mit Anilin behandelt, neben dem Hydroxyderivat ein De(hydrochlorid) methylhämin, das sich nach der Alkoholmethode (vgl. S. 216) nicht in ein Dimethylhämin verwandeln läßt, während unter gleichen Bedingungen aus dem nicht methylierten α-De-(hydrochlorid)-hämin Dimethylhämin erhalten wird. Danach muß im Chemismus der Abspaltung des Halogenwasserstoffes ein Unterschied bestehen, der sich durch die Konfiguration der Häminmoleküle regelt, und zwar einmal durch die Art des Halogens und zweitens durch das Karboxyl, dessen Wasserstoff zur Abspaltung des Halogenwasserstoffes herangezogen wird — vorerst ist wenigstens kein Grund zu einer anderen Annahme vorhanden, als daß bei dieser Abspaltung der Karboxylwasserstoff beteiligt ist.

Was das Halogen betrifft, so ist das Chlor hauptsächlich mit dem Eisen verbunden, daneben bestehen Beziehungen zu einem der basischen Stickstoffatome oder zu beiden, wodurch auch das Eisen mit diesen Atomen in Verbindung tritt, was wiederum die

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 212 (1910); *A. Hamsik*: Ebenda. **80**. 35 (1912).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 157 (1912).

Festigkeit seiner Bindung im Hämin zur Folge hat. Im Bilde lassen sich diese Verhältnisse wie folgt darstellen:

$$\rangle N\,Cl - Fe\langle \;\rightleftarrows\; \rangle \underset{\diagdown Cl}{N} - Fe\langle ,$$

auf welchen Gleichgewichtszustand die Art des Lösungsmittels einen Einfluß hat. Im Bromhämin ist das Gleichgewicht der Natur des Halogens entsprechend nach rechts verschoben. Danach wird sich nun für das De(hydro c h l o r i d)hämin die Anordnung

$$\rangle N \rangle Fe - O - \underset{|}{C}\,O,$$

für das De(hydro b r o m i d)hämin dagegen die Anordnung

$$O : \underset{|}{C} - O - \rangle N - Fe\langle$$

ergeben, so daß man zwischen einem O- und einem N-De(hydrohalogen)hämin zu unterscheiden hat, und das letztere widersteht der Anlagerung von Halogenwasserstoff an das Eisen zur Bildung eines echten Hämins. Eine ähnliche Bindung ergibt sich endlich auch dann, wenn das gewöhnlich reagierende Karboxyl verestert ist und nun das zweite Karboxyl mit seinem Wasserstoff bei der Abspaltung von Halogenwasserstoff reagiert. Es kann dann weder zur weiteren Methylierung, noch zur Bildung eines echten Hämins kommen, wie es der Ausfall der Versuche gezeigt hat[1].

Darstellung von De(hydrochlorid)hämin.

Höchstens 5 *g* rohes α-Chlorhämin (je größere Mengen angewendet werden, um so schwerer gelingt es, alles Chlor zu entfernen) werden in einer Schale mit frisch destilliertem Anilin angerieben und die Masse mit Anilin in eine weithalsige Flasche übergespült, so daß dessen Menge etwa 110 *g* beträgt. Dann schüttelt man auf der Maschine zwei Stunden lang, filtriert und wäscht mit ein wenig Anilin nach. Auf dem Filter bleiben die Verunreinigungen zurück, deren Menge nach Entfernung des anhaftenden Anilins durch eine Extraktion mit Äther bestimmt werden kann. Das Filtrat wird durch einen Tropftrichter in 2 *l* 20%iger

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**. 43 (1917).

Essigsäure, welche durch einen Rührer in heftiger Bewegung erhalten wird, eingetragen, wobei sich das Reaktionsprodukt zunächst in harziger Form absetzt, bald aber bröcklig wird. Nach eintägigem Stehen gießt man die Flüssigkeit durch ein Filter ab und bringt den Farbstoff in eine Schale, reibt die Stücke von neuem mit 20%iger Essigsäure an, sammelt die Masse auf dem Filter und wäscht mit Essigsäure aus, bis das Ablaufende Anilinreaktionen nicht mehr gibt. Das zunächst auf Fließpapier, dann im Vakuum getrocknete Präparat wird nun zwei bis drei Tage lang mit Äther extrahiert, bis der Rückstand, welchen der Äther immer, wenn auch in geringer Menge, hinterläßt, an verdünnte Salzsäure Anilin nicht mehr abgibt[1]). Das alsdann getrocknete Präparat gibt bei der Analyse Werte, aus denen hervorgeht, daß es der Hauptsache nach aus dem De(hydrochlorid)hämin $C_{34}H_{31}O_4N_4Fe$ besteht, daneben enthält es Hydroxyhämin $C_{34}H_{32}O_4N_4FeOH$ und gewöhnlich noch Spuren von Chlor. Es stellt eine dunkelbraunviolette, abfärbende, amorphe Masse dar, die sich in Eisessig leicht löst, in anderen Solventien aber kaum löslich ist; auch in verdünnten Säuren löst sie sich nicht. Sie geht aber sofort restlos in Lösung nach Zusatz von Alkohol oder Azeton, sobald einige Tropfen verdünnte Schwefelsäure zugefügt werden.

Beim Zusammenreiben mit konzentrierter Schwefelsäure wird der größte Teil des Eisens entfernt, ohne daß Lösung eintritt; gießt man dann die Masse in viel kaltes Wasser, so nimmt dieses höchstens Spuren von Farbstoff (Porphyrin) auf; es verhält sich somit das De(hydrochlorid)hämin wie das Hämatin, während sich Hämin in konzentrierter Schwefelsäure auflöst. De(hydrochlorid)hämin löst sich in zwei Molekülen Alkali pro Farbstoffmolekül auf; aus dieser Lösung läßt sich bald nach der Darstellung ein Silbersalz erhalten, das zwei Atome des Metalles enthält und der Zusammensetzung nach der Formel $C_{34}H_{30}AgO_4N_4FeOH + H_2O$ entspricht. Nach längerer Aufbewahrung der alkalischen Lösung werden mit 1%iger Silbernitratlösung Niederschläge erhalten, die bedeutend weniger Metall enthalten. Die Silbersalze lösen sich in Alkalien kolloid auf, aus ihrem Verhalten gegen Säuren geht wie aus dem der Salze mit anderen Metallen hervor, daß das Eisen in ihnen nicht mehr so fest gebunden ist wie im Hämatin selbst[2]). Fällt man die Lösung des De(hydrochlorid)hämins in Laugen durch eine Säure, so wird ein Stoff erhalten, der in allen äußeren Eigenschaften dem Hämatin gleicht; unter der Einwirkung des Alkalis erfolgt, und zwar all-

---

[1]) Durch den Äther wird Dianilinochinonanil entfernt, das sich aus dem Anilin durch die oxydierende Wirkung des im Hämin dreiwertigen Eisens gebildet hat. *W. Küster*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**. 2962 (1910).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 191 (1910).



mählich, eine Einlagerung von Wasser in die Moleküle des Farbstoffes[1]) α-De(hydrochlorid)hämin aus Ochsenblut läßt sich nach der beschriebenen Essigsäuremethode glatt in α-Hämin zurückverwandeln, nur bei lange Zeit aufbewahrten Präparaten versagen die Versuche[2]). Ebenso gelingt diese Häminregeneration mit dem Produkt, welches durch die Einwirkung von Anilin auf das nach *Mörners* Methode mit Hilfe von Äthylalkohol aus Ochsenblut bereitete β-Hämin gewonnen wird, wodurch eine Umwandlung der β- in die α-Form erreichbar ist (vgl. auch S. 218). Ferner eignet sich das α-De(hydrochlorid)hämin zur

Gewinnung des Dimethylesters des Hämins.

Man löst 1 *g* des Farbstoffes in 50 cm^3 absolutem Methylalkohol unter Zusatz von zehn Tropfen verdünnter Schwefelsäure auf und fällt die filtrierte, zum Sieden erhitzte Lösung mit 3 cm^3 25%iger Salzsäure. Der abgesaugte und mit verdünntem Methylalkohol SO_4 frei gewaschene Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und kann dann aus siedendem Eisessig (1:30) umkristallisiert werden. Allem Anschein nach wird hiedurch dasselbe Dimethylhämin erhalten, das sich nach folgendem Verfahren direkt aus α-Hämin gewinnen läßt.

5 *g* α-Hämin werden durch 5 *g* Chinin und 80 cm^3 Chloroform unter Schütteln gelöst, die Lösung filtriert und mit wenig Chloroform nachgespült. Inzwischen hat man 250 cm^3 absoluten Methylalkohol zum Sieden erhitzt und trägt nun zunächst 25 cm^3 konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·19), dann sofort das Gesamtfiltrat vorsichtig unter Rühren ein, indem man auf dem Wasserbade weiter erhitzt, bis sich der zum Rühren benützte Glasstab mit Kristallen beschlägt. Dann läßt man erkalten und saugt am nächsten Tage das Hämin ab, worauf mit Methylalkohol nachgewaschen wird, bis das Ablaufende nur noch schwach gefärbt erscheint, schließlich wird mit ganz verdünnter Salzsäure chininfrei gewaschen. Die Ausbeute beträgt 4 bis 4·5 *g*; sie wird durch die Bildung eines höher methylierten Hämins, das wahrscheinlich ein Anlagerungsprodukt von Methylchlorid an das Dimethylhämin vorstellt und das in Methylalkohol löslich ist, beeinträchtigt[3]). Das Dimethylchlorhämin löst sich sehr leicht in Azeton und Chloroform schon bei Zimmertemperatur sowie in heißem Benzol und siedendem Eisessig, welche Lösungsmittel daher zum Umkristallisieren geeignet sind, da eine Verseifung durch den Eisessig nicht stattfindet. Man erhält es in Form von gekreuzten oder zu Rosetten

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 156 (1912).
[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**. 165 (1910).
[3]) *W. Küster*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1940 (1912).

gruppierten Nadeln. Ein Schmelzpunkt konnte beim Erhitzen bis über 300° nicht festgestellt werden.

Das Dimethylchlorhämin wird durch 1%ige Natronlauge bei Zimmertemperatur, durch eine Sodalösung selbst bei halbstündigem Erhitzen im siedenden Wasserbade nicht verändert, während $^1/_2$ N-Ammoniak einen Teil des Chlors herausnimmt, ohne daß Farbstoff in Lösung geht. In Pyridin und Anilin löst sich das Dimethylhämin auf, wobei das Chlor ionisiert wird; gießt man die Lösung in Anilin in 20%ige Essigsäure, so fällt der Farbstoff als Dimethylhydroxyhämin aus, während sich der größte Teil seines Chlors im Filtrat befindet. Das getrocknete Dimethylhydroxyhämin läßt sich dann durch Äther in eine hierin lösliche und in eine unlösliche Fraktion trennen. Aus beiden Teilen kann nach der Alkoholmethode wieder Dimethylhämin erhalten werden[1]).

Auf ähnlichem Wege kann der Diäthylester des α-Chlorhämins hergestellt werden, wobei die folgende Vorschrift von *Nencki* und *Zaleski*[2]) peinlichst befolgt werden muß: 4 *g* α-Hämin werden in 4 *g* Chinin und 200 *cm*³ kaltem Chloroform gelöst und die Lösung filtriert. Andererseits werden 350 *cm*³ absoluter Alkohol und 35 *cm*³ konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·19) zum Kochen erhitzt und nach Zusatz der Chloroformfarbstofflösung noch fünf Minuten lang im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten findet sich dann eine Abscheidung vor, die das Diäthylhämin vorstellt und durch Absaugen und Auswaschen mit stufenweis verdünntem Alkohol zu isolieren ist, worauf sie über Schwefelsäure und Natriumhydroxyd getrocknet wird. Der Stoff ist in Chloroform leicht löslich, seine Zusammensetzung entspricht der Formel:

$$C_{34}H_{30}(C_2H_5)_2O_4N_4FeCl.$$

Dimethyl(chlor)hämin kann auch mit Hilfe von Dimethylsulfat[3]) erhalten werden:

a) 5 *g* Rohhämin, nach *Mörners* Methode mit Methylalkohol dargestellt, werden in 50 *cm*³ Methylalkohol, der 1·8 *g* Kaliumhydroxyd = vier Moleküle gelöst enthält, durch kurzes Schütteln gelöst, die sofort — ohne Rückstand — filtrierte Lösung zum Sieden erhitzt und langsam 4 *g* Dimethylsulfat unter Umrühren hinzugegeben. Nach Beendigung der heftigen Reaktion wird in der Siedehitze mit 15 *cm*³ 25%iger Salzsäure versetzt und der hiebei sofort

---

1) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 186 (1913).

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 406 (1900).

3) *W. Küster* und *A. Greiner*: Ibid. **86**. 190 (1913).



und anscheinend quantitativ gefällte Farbstoff nach dem Erkalten abfiltriert, SO_4 frei gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 4·5 *g*. Das Präparat kann aus heißem Benzol oder Eisessig kristallisiert erhalten werden.

b) Die vollkommene Methylierung eines rohen β-Hämins vollzieht sich auch in saurer Lösung.

10 *g* fein gepulvertes und bei 90° getrocknetes Rohhämin werden in 16·3 *g* Dimethylsulfat verteilt und der einige Minuten auf dem Wasserbade erwärmten Mischung 50 *g* absoluter Methylalkohol zugefügt, worauf so lange erhitzt wird, bis der letztere abgedunstet ist. Hiebei entweicht Chlorwasserstoff, und es bildet sich das Sulfat, das nunmehr in 400 cm^3 Methylalkohol bei etwa einstündigem Kochen am Rückflußkühler löslich ist. Die Lösung wird filtriert und wieder zum Sieden erhitzt, worauf man langsam und unter Rühren 59 cm^3 einer 10%igen methylalkoholischen Kalilauge (= sieben Moleküle K OH) einträgt und dann sofort durch Zusatz von 100 cm^3 25%iger Salzsäure fällt. Die Ausbeute an SO_4·· frei gewaschenem und im Vakuum getrocknetem Farbstoff beträgt 8·5 *g*. Zur weiteren Reinigung wird wieder aus siedendem Benzol oder Eisessig umkristallisiert.

Während die Veresterung von α Chlorhämin mit Methylalkohol und Salzsäure gelingt, stößt die gleiche Operation bei Verwendung von α-Bromhämin auf Schwierigkeiten, insofern einmal die Methylierung nicht vollständig wird und andererseits ein im Methylalkohol leicht lösliches Produkt in größerer Menge entsteht[1]), was durch die Natur des Broms bezw. seine Stellung im Gesamtmolekül (vgl. S. 213) bedingt erscheint, da ja auch bei dieser Veresterung organische Basen zum Lösen des Hämins herangezogen werden müssen und von diesen angenommen werden kann, daß sie eine Abspaltung von Bromwasserstoff herbeiführen, wobei dieselben Stoffe wie bei der Einwirkung von Anilin auftreten.

Zur Darstellung von Dimethylbromhämin geht man daher entweder vom α-De(hydrochlorid)hämin aus Ochsenblut aus, das sich nach der Alkoholmethode in das gewünschte Präparat überführen läßt (auf 1 *g* des Farbstoffes verwendet man 50 cm^3 absoluten Methylalkohol, zehn Tropfen verdünnte Schwefelsäure und zum Fällen der siedenden Lösung 3 cm^3 66%ige Bromwasserstoffsäure[2]) oder man verdrängt das Chlor des Dimethyl(chlor)hämins durch Brom[3]).

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 126 (1914); **101**. 58 (1917).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 200 (1913).

[3]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 129 (1914).



1 *g* des Farbstoffes wird in 30 cm^3 Chloroform gelöst und die Lösung in 50 cm^3 siedenden absoluten Methylalkohol, der 3 cm^3 66%ige Bromwasserstoffsäure enthält, eingetragen. Die Abscheidung wird am nächsten Tage abgesaugt, mit Methylalkohol und dann schließlich mit Wasser säurefrei gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zum Umkristallisieren benützt man auf einen Teil 40 Teile siedenden Eisessigs, das Dimethyl(brom)hämin kristallisiert dann beim Erkalten in sternförmig gruppierten Spindeln heraus.

Monomethylierte (Brom)hämine finden sich in den Teilen roher β-Hämine, die in Chloroform bei der Extraktion zunächst löslich sind, nach Abdestillation des Chloroforms aber zurückbleiben, wenn der Rückstand wieder in Chloroform aufgenommen wird. Aus dem von vornherein im genannten Lösungsmittel unlöslichen Teil eines rohen β-Hämins kann ein Monomethylbromhämin auf folgendem Wege erhalten werden:

6 *g* des Hämins (aus Ochsenblut gewonnen) werden in 7·5 cm^3 Pyridin und 40 cm^3 Chloroform gelöst, die Lösung filtriert und das Filter mit 20 cm^3 Chloroform nachgespült. Das Filtrat wird in 250 cm^3 absoluten Methylalkohol eingetragen, der zum Sieden erhitzt und dann mit 25 cm^3 48%iger Bromwasserstoffsäure versetzt worden war. Das Reaktionsprodukt scheidet sich sehr bald ab, wird aber erst am nächsten Tage abgesaugt und ausgewaschen. Nach dem Trocknen befreit man es durch Ausschütteln mit Benzol vom wenig beigemengten Dimethyl(brom-)hämin. Das Monomethylbromhämin kristallisiert in prächtig ausgebildeten würfelähnlichen Formen und scheidet sich auch aus einer Lösung in Chloroform in solchen Kristallen ab, während unter der Einwirkung von Methyläthylketon allmählich eine Umwandlung in kleine Nadeln und Prismen stattfindet. Mit derselben geht eine Änderung der Eigenschaften Hand in Hand insofern, als jetzt durch 5%ige Sodalösung sofort Lösung eintritt, während die Würfelform sich anscheinend nicht löst; wahrscheinlich bildet sich ein schwer lösliches Natriumsalz, denn auf Zusatz von Wasser tritt Lösung ein. Durch das Alkali wurde in jedem Fall Brom abgespalten.

Nun können ja, vorausgesetzt, daß die beiden Karboxyle des Hämins nicht gleichwertig sind, wofür bereits viele Beobachtungen sprechen, zwei isomere Monoalkylhämine existieren, und es sei in diesem Zusammenhange erwähnt, daß gerade bei monoalkylierten Häminen öfters Änderung der Eigenschaften beobachtet worden ist, nachdem sie einer Umscheidung bei Zimmertemperatur unterworfen worden waren. Diese Änderungen betreffen die Kristallform, die Löslichkeit in Chloroform und das Verhalten gegen Sodalösung.

Die Umscheidung wird dadurch bewirkt, daß das Hämin (2 *g*) mit Hilfe von Chinin (1 *g*) und Chloroform (15 cm^3) gelöst, die Lösung filtriert und das Filter mit ein wenig Chloroform (zweimal je 5 cm^3) nachgespült wird, worauf das Filtrat in 90%igen Methylalkohol (100 cm^3), der 25%ige Bromwasserstoffsäure (2·5 cm^3) enthält, eingetragen wird. Aus dieser Lösung kristallisiert dann das Hämin im Laufe von 24 Stunden heraus (Ausbeute 1·2 *g*).

Der ungesättigte Charakter des Hämins.

Wie aus der empirischen Formel, speziell aus der Anzahl der Wasserstoffatome, hervorgeht, ist das Hämin ein stark ungesättigter Stoff, und zwar handelt es sich um vier Stellen des Moleküls, von denen je zwei anscheinend gleichwertig sind, die je zwei Atome Wasserstoff zur Absättigung erfordern. Mit der Reduktion der einen Gruppe ändern sich die Eigenschaften nicht wesentlich, nur wird die Beständigkeit des Moleküls erhöht, wie vorauszusehen ist, wenn es sich um ungesättigte Seitenketten handelt. Beim Hämin kämen dann Vinyle in Betracht, die in Äthyle übergeführt werden, wofür die Resultate bei dem Abbau durch Oxydation (vgl. S. 257) sprechen. Die andere Gruppe bedingt den Charakter des Hämins als Farbstoff; durch Anlagerung von Wasserstoff an diesen Stellen entsteht Farblosigkeit, worauf im Zusammenhang mit der Porphyrinbildung zurückgekommen werden soll.

Zunächst seien einige Häminderivate beschrieben, in welchen nur die erste Gruppe ungesättigter Stellen eine Veränderung erfahren hat.

A. Anlagerung von Brom an Ester des Hämins[1]).

a) 5 *g* Dimethyl(chlor)hämin werden in 250 cm^3 siedenden Eisessigs gelöst, die Lösung filtriert und rasch gekühlt, worauf 2·5 *g* Brom, in Eisessig gelöst, unter Turbinieren eingetropft werden, was die Bildung eines Niederschlages zur Folge hat, ohne daß Bromwasserstoffentwicklung eintritt. Der Niederschlag wird abgesaugt und die Mutterlauge durch Eisessig verdrängt, worauf mit verdünnter Essigsäure, dann mit kaltem Wasser säurefrei gewaschen wird, schließlich wird auf Ton gestrichen und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute beträgt 5 *g* eines schwarzbraunen, in Benzol nicht, in Chloroform sehr leicht löslichen Stoffes, dem nach seiner Zusammensetzung die Formel $C_{36} H_{36} O_4 N_4$ Fe Cl Br_2 zukommt und der daher als Dibromid des Chlorhämindimethylesters betrachtet werden kann.

---

[1]) *W. Küster* und *A. Greiner*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 198/201 (1913).

b) 3 *g* Dimethyl(brom)hämin werden in 100 *g* Chloroform gelöst und die Lösung nach Zugabe von 1·33 *g* Brom (= vier Atome), ebenfalls in Chloroform gelöst, zwei Stunden geschüttelt, darauf wird sie filtriert und das Filtrat unter Lichtabschluß stehen gelassen, bis das Chloroform zum größten Teil verdunstet ist. Jetzt wird durch Zusatz von Petroläther das Reaktionsprodukt gefällt, abgesaugt und mit Petroläther ausgewaschen. Die Ausbeute beträgt 3·6 *g*. Zur Entfernung kleiner Mengen eines Tetrabromderivates wird 1 *g* aus 30 cm^3 siedenden Eisessigs umkristallisiert. Die sich beim Erkalten in guter Ausbeute abscheidenden, sehr kleinen Kriställchen von fast schwarzer Farbe sind unlöslich in Äther und Methylalkohol, löslich in Benzol und Azeton, sehr leicht löslich in Chloroform und entsprechen in ihrer Zusammensetzung der Formel $C_{36} H_{38} O_4 N_4 Fe Br_3$.

B. Darstellung von **Mäsohämin** $C_{34} H_{36} O_4 N_4 Fe Cl$.

Die Reduktion der ungesättigten Seitenketten des Hämins gelingt nach einem von *H. Fischer* und *H. Röse*[1]) ausgearbeiteten Verfahren auf folgendem Wege:

50 *g* Kalium werden in 290 *g* Methylalkohol gelöst, die Lösung wird in einem eisernen Autoklaven von zirka 1 *l* Inhalt gefüllt und 25 *g* Hämin in dieselbe eingetragen, wonach durchgerührt, der Autoklav verschlossen und angeheizt wird, so daß die Temperatur des Ölbades auf 240 bis 250° steigt, bei welcher etwa eine Stunde zu halten ist, weitere fünf Stunden dann bei 220°. Im Innern beträgt dann die Temperatur 143 bis 175°, während der Druck ganz allmählich auf 16·5 Atmosphären steigt. Zu beachten ist, daß bei Innentemperaturen über 200° der Druck auf 97 Atmosphären steigt und daß dann das Hämin eine Aufspaltung erfährt, was also vermieden werden muß. Nach dem Erkalten ist kaum noch Druck vorhanden. Der Inhalt des Autoklaven wird dann mit Wasserdämpfen destilliert, wobei nur Spuren von Öl übergehen, der dunkel gefärbte Rückstand filtriert und das Filtrat mit Essigsäure angesäuert. Der hiebei entstehende voluminöse Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Im Filtrat sind keine Pyrrole oder höchstens Spuren davon vorhanden.

Der noch feuchte Niederschlag wird nun in einer Reibschale mit 96%igem Alkohol verrieben und in eine 2 *l*-Flasche gespült, so daß die Menge des Alkohols etwa 1 *l* beträgt. Nach mehrstündigem Schütteln wird filtriert und der Rückstand gut mit Alkohol ge-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**. 14 (1913).

waschen; seine Menge beträgt nach dem Trocknen immerhin 10 *g*. Das Reduktionsprodukt befindet sich in der alkoholischen Lösung; sie wird eingedunstet, wobei sich bald körnige, aber nicht kristallisierte Massen im Gewicht von 9·8 *g* abscheiden. Diese werden nun in 27 cm^3 Pyridin und 45 cm^3 Chloroform einige Zeit geschüttelt, wobei der größte Teil in Lösung geht, und die klar filtrierte Lösung langsam in 630 cm^3 Eisessig, der mit 9 cm^3 Salzsäure und 9 cm^3 gesättigter Kochsalzlösung versetzt und auf 105° erhitzt war, eingetragen. Nach 48stündigem Stehen haben sich dann reichliche Mengen, etwa 4 *g*, Mesohämin in schön kristallisiertem Zustande abgeschieden.

Es sei noch erwähnt, daß die Operation auch in schwer schmelzbaren Jenaer Glasröhren bei Innehaltung der gleichen Bedingungen gelingt (21·5 *g* Kalium wurden in 160 cm^3 absolutem Alkohol gelöst, hiezu 10 *g* fein gepulvertes Hämin gegeben und die Mischung, auf zwei Röhren verteilt, fünf Stunden auf 175° erhitzt), daß aber nur peinlichste Beobachtung der gegebenen Vorschriften, namentlich auch in bezug auf die Konzentration des Alkalis, zum kristallisierten Mesohämin führt, und daß letzteres nur aus den alkohollöslichen Teilen des Reaktionsproduktes zu erhalten ist, trotzdem auch der unlösliche Teil reduziert erscheint, da sich Mesoporphyrin daraus gewinnen läßt. Hier zeigt sich also eine Ähnlichkeit mit dem Verhalten des durch Einwirkung von Laugen aus dem Hämin entstehenden Hämatins.

Es sei ferner erwähnt, daß die Darstellung des Mesohämins auch von *Willstätter* und *M. Fischer*[1]) beschrieben wird. Sie empfehlen den Zusatz von Pyridin (100 cm^3 auf 3 *g* Hämin) und reduzieren mit Hilfe von 50 cm^3 konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge durch vier- bis viereinhalbstündiges Erhitzen im Autoklaven bei 200°.

Das M e s o h ä m i n bildet häminähnliche glänzende Prismen oder sehr dünne, in der Durchsicht gelbbraune Blättchen. Es ist in den meisten Lösungsmitteln schwer löslich, doch färbt es diese, z. B. Alkohol und Chloroform, mehr an als Hämin. In Azeton ist es zum Unterschied vom Hämin mäßig löslich. Die spektroskopische Untersuchung ergibt gegenüber dem Hämin keinen Unterschied, auch in chemischer Hinsicht ist insofern ein verschiedenes Verhalten nicht festgestellt worden als das Mesohämin gerade so wenig wie das Hämin befähigt ist, mit verdünnten Säuren Salze zu bilden. Auch der Mesohämindimethylester, den *Willstätter* und *Max Fischer* dadurch erhielten, daß sie 2·8 *g* Mesohämatin, also den in Alkohol löslichen Teil des Reduktionsproduktes des Hämins in 2·5 *l* Holz-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 488 (1913).

geist lösten und die warme Lösung mit 1 *l* konzentrierter Salzsäure versetzten, bildet kein salzsaures Salz. Er kristallisiert in prächtigen, metallglänzenden braunen Nadeln, ist sehr leicht in Azeton und Chloroform löslich und läßt sich dadurch umkristallisieren, daß seine Lösung in Pyridin in methylalkoholische Salzsäure eingetragen wird.

Studien auf dem Gebiete der Porphyrine.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Porphyrine sind gefärbte Stoffe, die sich von der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes oder vom Blattfarbstoff ableiten. Sie haben basische Eigenschaften und sind befähigt mit Metallen komplexe Salze zu geben. Die Farbe der Porphyrine ist verschieden, doch ist immer selektive Absorption des Lichtes vorhanden, die Lösungen der Porphyrine fluoreszieren mehr oder weniger stark. Durch Addition von zweimal zwei Atomen Wasserstoff gehen sie in Leukoverbindungen über, die sich an der Luft wieder zu den Farbstoffen oxydieren. Die Leukoverbindungen können Metalle nicht mehr in komplexe Bindung aufnehmen.

Die basischen Eigenschaften sind durch Stickstoffgehalt bedingt, und zwar sind in allen Porphyrinen vier Stickstoffatome enthalten, die vier Pyrrolkernen entsprechen. Zwei von ihnen sind als echte Pyrrole, zwei als Pyrrolenringe enthalten, da die Porphyrine zweisäurige Basen sind. Diese Symmetrie erscheint also für die Komplexsalzbildung notwendig. Die meisten Porphyrine haben auch saure Eigenschaften, welche durch Karboxyle bedingt sind. Der Name „Porphyrin" stammt von *Hoppe-Seyler*[1]) her, der bei den Versuchen, das Eisen des Hämatins mit Hilfe konzentrierter Schwefelsäure abzuspalten, eine gefärbte Lösung erhielt, aus der er sein Hämatoporphyrin dann isolierte. Bei seinen Untersuchungen über das Chlorophyll stieß er dann auf einen Stoff, dessen Spektrum in saurer wie in alkalischer Lösung an das des Hämatoporphyrins erinnerte, und nannte ihn Phylloporphyrin. Bei den Versuchen, das Hämatoporphyrin in den letztgenannten Stoff überzuführen, fand *M. Nencki*[2]) die elegante Methode auf, das Eisen des Hämins durch Eisessigbromwasserstoff zu eliminieren und im Eisessigjodwasserstoff lehrte er das zweckmäßigste Reduktions- und Aufspaltungsmittel für die Porphyrine kennen.

Das zum Hämin gehörige Porphyrin ist noch nicht bekannt; es müßte die Zusammensetzung $C_{34} H_{34} O_4 N_4$ besitzen. Läßt man

---

[1]) Lehrbuch der physiol. Chem. S. 312 und 396 (Berlin, *A. Hirschwald*).

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **24**. 430 (1888).

das zuerst genannte *Nencki*sche Reagens auf Hämin einwirken, so bildet sich in zwei Stufen das

Hämatoporphyrin $C_{34}H_{38}O_6N_4$

nach folgenden Gleichungen:

$$C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl + 4\,HBr = FeClBr_2 + C_{34}H_{34}O_4N_4H_2Br_2 \quad I$$
$$C_{34}H_{34}O_4N_4H_2Br_2 + 2\,H_2O = 2\,HBr + C_{34}H_{36}O_4N_4(OH)_2 \quad II$$

woraus hervorgeht, daß das Hämatoporphyrin zwei alkoholische Hydroxyle enthalten muß neben zwei Karboxylen, die vom Hämin übernommen worden sind. Das Hämatoporphyrin bildet also Äther und Ester und ist zudem eine zweisäurige Base.

Der Übergang des Hämins in das Hämatoporphyrin besteht also einmal in der Abspaltung des Eisens und dann in der Anlagerung von zwei Molekülen Wasser an das eine Paar der ungesättigten Stellen. Zunächst bildet sich aber nach Gleichung I ein Bromwasserstoffanlagerungsprodukt, das als

Bromwasserstoffester des Hämatoporphyrins

aufgefaßt werden kann und in Form des Dibromhydrats von *Willstätter* und *M. Fischer*[1]) auf folgendem Wege zu gewinnen ist.

3 *g* grobe Häminkristalle werden in einer Stöpselflasche mit 75 *g* Eisessigbromwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·41 bei 0° bestimmt) während eines Tages geschüttelt und die entstandene Lösung durch Talk- — ohne Rückstand — filtriert. Beim Eingießen des Filtrates in 2 *l* trockenen Äthers fällt das Hydrobromid in hellroten Flocken aus; nur wenn der Eisessigbromwasserstoff Wasser enthielt oder wenn der Äther feucht war, entsteht eine sirupöse Fällung. Der Niederschlag wird dann mit Äther ausgewaschen, bis das anhängende Ferribromid völlig entfernt ist. Die Ausbeute beträgt 4 *g*. Das Salz ist hygroskopisch; im Hochvakuum bei 105° verliert es zwei Moleküle Bromwasserstoff, doch wird die Substanz hiebei verändert. In Azeton, Eisessig und Chloroform ist das Salz löslich mit grünlichroter Farbe, in Alkohol mit blauroter. Durch Wasser tritt ein Ersatz zweier Bromatome durch Hydroxyle ein, doch sind die Bromatome ungleich beweglich. So läßt sich das eine z. B. durch den Essigsäurerest auf folgendem Wege ersetzen:

Eine Auflösung von 7 *g* Hämin in 200 *g* Eisessigbromwasserstoff wird mit demselben Volumen Eisessig versetzt, die Lösung filtriert und unter Rühren 100 *g* kristallisiertes Natriumazetat eingetragen,

[1]) H. **87**. 447 (1913).



wobei die Nuance der Flüssigkeit von bräunlichem Rot zu Violettrot umschlägt. Auf Zusatz von Wasser fällt dann ein braunrotes Pulver (9 *g*) aus, das man durch Lösen in absolutem Alkohol, Zugabe von viel Äther und Wegwaschen des Alkohols in ätherische Lösung bringt, aus der sich dann nach dem Trocknen und Einengen große, in der Durchsicht rubinrote Doppelpyramiden ausscheiden, deren Zusammensetzung der Formel $C_{34} H_{36} O_4 N_4 Br . O CO CH_3$ entspricht.

Ein Tribromhydrat des Hämatoporphyrin-Bromwasserstoffesters bildet sich bei Verwendung verflüssigten Bromwasserstoffgases.

5 *g* Hämin werden in ein Einschmelzrohr gefüllt und in demselben 10 bis 15 *g* Bromwasserstoff, der mit Kalziumbromid getrocknet worden ist, durch Kühlen mit flüssiger Luft verdichtet. Die Einleitungsröhre läßt man, damit sie durch den kristallisierenden Bromwasserstoff nicht verstopft wird, etwa 1 *cm* über dem *Dewar*-Gefäß enden. Nach dem Zuschmelzen der Röhre und Erwärmen auf Zimmertemperatur geht das Hämin mit grünlichviolettroter Farbe klar in Lösung. Man läßt einen Tag stehen und öffnet dann die Röhre, nachdem sie mit Kohlensäure-Äther abgekühlt worden ist. Das Bromwasserstoffgas wird unter Vermeidung der Feuchtigkeitsanziehung bei gewöhnlicher Temperatur, zum Schluß im Vakuum verjagt, wonach ein metallglänzendes, zerfließliches Produkt von violetter Farbe (10·3 *g*) verbleibt, aus dem durch mehrmaliges gründliches Verreiben mit Äther das Ferribromid vollständig entfernt werden kann. Die Substanz ist dann nicht mehr hygroskopisch und bildet eine spröde, glänzende, in der Durchsicht violette bis rote blätterige Masse, die keine Kristallform zeigt. Der Bromgehalt läßt auf eine Zusammensetzung, der Formel $C_{34} H_{39} O_4 N_4 Br_5$ entsprechend, schließen, die Reaktionen gleichen denen des Dibromhydrates des Hämatoporphyrinbromwasserstoffesters; man gelangt also leicht zu Derivaten des Hämatoporphyrins.

Von den vielen Vorschriften für die Darstellung des Hämatoporphyrins sei hier die folgende von *R. Willstätter* und *M. Fischer*[1]) wiedergegeben: 36 *g* Häminkristalle werden in 720 *g* Eisessigbromwasserstoff vom spezifischen Gewicht 1·41 (bei 0° bestimmt) auf einmal eingetragen, dann wird eine viertel Stunde geschüttelt. Der Farbstoff geht nun beim Stehen in sieben Stunden klar in Lösung, worauf diese in 5 *l* Wasser eingetragen und die Flüssigkeit durch eine dünne Talkschicht von wenigen körnigen Partikeln abfiltriert wird. Das Filtrat bleibt noch drei

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 461 (1913). Die Verwendung von alten Häminpräparaten ist zu vermeiden. (*W. Küster* und *P. Deihle*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 60 (1913).

Stunden stehen, in welcher Zeit sich der Ersatz des Broms durch Hydroxyd quantitativ vollzieht, und wird dann mit konzentrierter Natriumazetatlösung versetzt, wodurch das Hämatoporphyrin gefällt wird. Es wird filtriert, Br' frei gewaschen und bei Z. T. getrocknet. Die Ausbeute an noch eisenhaltigem Rohprodukt beträgt 34 *g*. Zur Reinigung löst man den noch feuchten Niederschlag in stark verdünnter Natronlauge auf, filtriert vom ungelösten Ferrihydroxyd und fällt das Filtrat durch Essigsäure. Zur Gewinnung von kristallisiertem Hämatoporphyrin wird der noch feuchte Schlamm des Farbstoffes aus 10 *g* Hämin in 1 *l* Alkohol gelöst und diese Lösung in 25 *l* Äther, die auf fünf Scheidetrichter mit je 7 *l* Inhalt verteilt sind, eingetragen, worauf der Alkohol weggewaschen wird, dadurch daß man durch jeden Scheidetrichter 20 Minuten lang am Brunnen Wasser fließen läßt, wobei ein wenig flockiges Kalziumsalz ausfällt. Die ätherische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und auf 1 *l* eingeengt; es beginnt dann schon in der Wärme Hämatoporphyrin auszufallen, reichlicher beim Stehen bei Z. T., und zwar als glänzende violette Kristallisation, die aus schön gerundeten, in der Durchsicht rotbraunen Blättchen besteht. Die Ausbeute an kristallisiertem Material beträgt zirka 5 *g*. Es ist in Äther schwer löslich, ebenso in Methylalkohol und 96%igem Äthylalkohol, etwas besser in absolutem Alkohol; Chloroform wird nicht angefärbt. In der Wärme löst es sich in Alkohol auch nur träge, während das amorphe Präparat in absolutem Alkohol leicht löslich ist. Azeton löst beträchtlich, Eisessig leicht mit prächtig violetter Farbe.

Im Hochvakuum bei 105° verliert das Hämatoporphyrin zwei Moleküle Wasser, durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure wird es in eine in Säuren wie in Alkalien unlösliche Substanz übergeführt.

Das Hämatoporphyrin ist in Ätzalkalien und in Soda leicht löslich, auch im Gegensatz zum Hämin in saurem Natriumkarbonat, hier genügt aber die berechnete Menge nicht; es ist ein Überschuß erforderlich[1]). Übrigens ist das Natriumsalz in Wasser schwer löslich und von *Nencki* und *N. Sieber*[2]) im kristallisierten Zustande erhalten worden. In wässeriger Lösung vermag das Hämatoporphyrin drei Moleküle Ammoniak zu binden, während das Silbersalz nur zwei Atome Metall enthält[1]).

Das salzsaure Salz des Hämatoporphyrins enthält zwei Moleküle Chlorwasserstoff, aus dem rohen Farbstoff im frisch gefällten Zu-

---

[1]) *W. Küster* und *P. Deihle*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 51 (1913).

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **24**. 430 (1888); Monatsschr. f. Chemie. **9**. 115; **10**. 568; Omnia opera *M. Nencki*. II. S. 74 und 754; Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 390 (1900).

stande bildet es sich dadurch, daß man ihn in einer Schale mit wenig Wasser zu einem dicken Brei anrührt und nun kleine Portionen Salzsäure von 0·7% solange hinzugibt, bis alles in Lösung gegangen ist, wobei man auf 75° erwärmen kann. Nach erfolgter Lösung filtriert man von geringen harzigen Rückständen und fügt zum Filtrat etwa ein Zehntel Volumen 40%ige Salzsäure. Sollte jetzt noch sogleich ein harziger Niederschlag entstehen, so filtriert man von neuem und stellt das Filtrat im Vakuum über Schwefelsäure zwei bis drei Tage auf, wonach die ausgeschiedenen Kristalle abgesaugt und mit 10%iger Salzsäure nachgewaschen werden. Durch einmaliges Umlösen mit Hilfe von auf 75° erwärmter 0·7%iger Salzsäure und Zusatz von einem Zehntel Volumen Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·19) wird das salzsaure Salz rein erhalten (*Zaleski*[1]). Die Kristalle, lange, dünne, nach beiden Enden zugespitzte, zu Büscheln vereinigte Nadeln werden zwischen Fließpapier abgepreßt, sodann im Exsikkator über Schwefelsäure und Natronkalk bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Jedes Erwärmen ist zu vermeiden, da unter Entweichen von Chlorwasserstoff Zersetzung eintritt; auch erleiden die Kristalle beim Lösen in Wasser hydrolytische Spaltung. Unter dem Mikroskop erscheinen die Nadeln des salzsauren Hämatoporphyrins, die ein schön rotes Pulver geben, olivgrün. Nach *Willstätter* und *M. Fischer*[2]) erhält man das Salz am besten durch Auflösen von Hämatoporphyrin in mäßig warmer 3%iger Salzsäure; man hat dann eben Zeit, die Lösung zu filtrieren, worauf sich die ganze Menge des Salzes abscheidet.

Aus ätherischer Lösung gehen vom Hämatoporphyrin an 0·03%ige Salzsäure nur Spuren, an 0·4%ige beim einmaligen Durchschütteln fast die ganze Menge über.

Absorptionsspektren. Die wässerige Lösung des salzsauren Hämatoporphyrins weist zwei Absorptionsbänder auf, einen schmalen, nicht sehr dunklen Streifen im Orange zwischen *C* und *D*, nahe an *D*, und einen zweiten, breiteren, dunklen zwischen *D* und *E*. Der Raum zwischen beiden zeigt matte, schwache Absorption. Auf Zusatz überschüssiger Natronlauge verändert sich das Spektrum, und man beobachtet nun vier Streifen im Rot, Gelb und Grün, von denen der zwischen *E* und *F* liegende am breitesten ist[3]).

Das Spektrum des kristallisierten Hämatoporphyrins in ätherischer Lösung weist außer einem schwachen, dünnen Streifen im Orange vier Absorptionsbänder auf, einen sehr schmalen scharfen und dunklen im Orange gegen Rot hin, einen schmalen, etwas

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 59 (1902).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 461 (1913).

[3]) Das Spektrum ist von der Dissoziation der Salzlösung abhängig. Vgl. *R. Willstätter*, *Pfannenstiel* und *Fritzsche*: Ann. d. Chem. **358**. 262 (1907); **371**. 116 (1909).

weniger dunklen beim Beginn vom Grün, dem ein sehr breiter, die gelbe Region ausfüllender Schatten vorgelagert ist, und zwei starke Bänder im Grün und beim Übergang vom Grün in Blau. Das letztere ist das dunkelste und weitaus breiteste (*Willstätter* und *M. Fischer*[1]).

Derivate des Hämatoporphyrins.

a) Der Dimethylester bildet sich nach *Willstätter* und *M. Fischer*[2]) schon beim Stehen einer methylalkoholischen, 8% Salzsäure enthaltenden Lösung des Hämatoporphyrins bei Z. T. oder dadurch, daß man die Lösung von 1·5 *g* Hämatoporphyrin in 75 cm^3 Methylalkohol, der 1% Chlorwasserstoff enthält, zehn Minuten am Rückflußkühler erhitzt und sie dann in 1 *l* ganz verdünnte Natriumazetatlösung eingießt. Der hiebei entstandene hellrote Niederschlag wird abgesaugt, Cl′ frei gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt ist in Karbonaten auch beim Erwärmen unlöslich; beim Kochen mit Natronlauge geht es langsam in Lösung. Viel rascher erfolgt die Verseifung durch alkoholische Lauge und durch Säuren. Der Ester ist z. B. gekennzeichnet durch die Salzsäurezahl $^1/_2$, d. h. er geht aus ätherischer Lösung rasch in 0·5%ige Salzsäure über (*Willstätter* und *M. Fischer*[3]). Schüttelt man aber mit 5%iger Salzsäure aus und läßt die salzsaure Lösung im Vakuum über Schwefelsäure stehen, so kristallisiert das Dichlorhydrat des Hämatoporphyrins aus. Diese rasch erfolgende Verseifung ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Estermethyle an derselben Stelle des Moleküls stehen, an der die Anlagerung des Chlorwasserstoffes erfolgt, d. h. daß betainartige Bindung

$$-CO-O-\overset{\diagdown}{\underset{\diagup\!\!\diagup}{N}}-CH_3$$

vorliegt (*W. Küster* und *P. Deihle*[2]).

Der Dimethylester des Hämatoporphyrins ist leicht löslich in Methylalkohol und Äther und hinterbleibt beim Abdampfen in Form einer spröden, glänzenden, dunkelroten Kruste vom Schmelzpunkt 149°. Im kristallisierten Zustande ist er bis jetzt nicht erhalten worden.

b) Das Tetramethylhämatoporphyrin oder der **Dimethylester des Hämatoporphyrindimethyläthers**

$$C_{32}H_{34}N_4(CO\,O\,CH_3)_2(O\,CH_3)_2$$

kann auf verschiedenen Wegen erhalten werden.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 467 (1913).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 469 (1913).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 64 bis 69 (1913).

a) Die mit Hilfe von Eisessigbromwasserstoff gewonnene Lösung von 5 *g* Hämin wird unter vermindertem Druck bei 70° Wasserbadtemperatur möglichst vollständig abdestilliert und der dunkelviolette Rückstand mit 100 *g* absolutem Methylalkohol zehn Minuten lang auf 50° erwärmt, wobei er vollständig in Lösung geht. Die filtrierte tiefrote Lösung wird darauf mit einer Auflösung von 4 *g* Kaliumhydroxyd in 30 *cm*³ Methylalkohol versetzt, der hiebei entstehende Niederschlag abgesaugt und mit Methylalkohol nachgewaschen. Aus dem Filtrat setzen sich dann beim Stehen in einigen Tagen bis 2·5 *g* große, schwarzrote Kristalle ab, die bei 128° schmelzen und das Tetramethylhämatoporphyrin vorstellen. Aus der Mutterlauge können weitere Mengen desselben durch Eingießen in verdünnte Natriumazetatlösung erhalten werden. Die Estermethyle werden beim Stehen in 5%iger salzsaurer Lösung leicht verseift[1]).

b) *R. Willstätter*[2]) verwendet das durch Einwirkung verflüssigten Bromwasserstoffgases auf Hämin erhaltene und durch Entfernung des Ferribromids mittels Äther gereinigte Bromid $C_{34}H_{39}O_4N_4Br_5$ (vgl. S. 225), indem er 2 *g* davon mit 100 *cm*³ Methylalkohol drei Tage lang stehen läßt, bis die ganze Menge ihre sauren Eigenschaften verloren hat. Dann wird das Reaktionsprodukt in Äther übergeführt und nach dem Waschen mit verdünnter Lauge und viel Wasser die getrocknete ätherische Lösung stark eingeengt. Die sehr leicht lösliche Tetramethylverbindung kristallisiert in großen, glänzenden Doppelpyramiden aus, deren Pulver leuchtend rot ist. Bei ziemlich raschem Erhitzen im Schmelzpunktrohr wird das Entweichen von Methylalkohol beobachtet, dann Sintern und Schmelzen bei 163° unter starkem Aufschäumen. Die Salzsäurezahl der Verbindung ist 3, d. h. erst eine 3%ige Salzsäure nimmt sie aus ätherischer Lösung vollständig fort. Sie ist also weniger basisch als das Hämatoporphyrin, was wiederum auf intramolekulare Salzbildung hinweist. In der prächtig violettroten salzsauren Lösung stellt sich daher sehr bald Verseifung der Estermethyle ein.

Dank der Leichtlöslichkeit des Tetramethylhämatoporphyrins konnte von *Willstätter* auch die Molekulargröße desselben, und zwar nach der kryoskopischen Methode mit Hilfe von Veratrol als Lösungsmittel festgelegt werden. Die Bestimmungen ergeben Zahlen, welche der Formulierung mit 34 Kohlenstoffatomen entsprechen. Und da durch Eisessigbromwasserstoff aus der Tetramethylverbindung das Hämatoporphyrin hervorgeht, folgt auch für diesen Stoff ein der einfachen Formel $C_{34}H_{38}O_6N_4$ entsprechendes Molekulargewicht.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 64 bis 69 (1913).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 449 (1913).

c) Der

Dimethyläther des Hämatoporphyrins $C_{32} H_{34} N_4 (CO OH)_2 (O CH_3)_2$ ist zuerst von *W. Küster*[1]) amorph, dann von *Willstätter*[2]) im kristallisierten Zustande erhalten worden. Für die Herstellung sei die Vorschrift von *W. Küster* und *H. Bauer*[3]) angegeben, da bei dieser Gewinnung ein Nebenprodukt erhalten wird, aus dessen Zusammensetzung hervorgeht, daß die Addition von Bromwasserstoff ohne Abspaltung von Eisen vor sich gehen kann, daß also Porphyrinbildung und Addition zwei getrennt voneinander verlaufende Veränderungen des Hämins vorstellen[4]), was für die Konstitution des Hämins von Bedeutung ist.

Zunächst wird, wie S. 229 beschrieben, aber unter Verwendung von Bromhämin die Lösung der Tetramethylverbindung in Methylalkohol hergestellt, wobei man möglichst wenig Alkohol verwendet, (auf 15 *g* Hämin genügen 100 cm^3), dann wird mit 0·75 *l* Äther versetzt und so lange gewaschen, bis eine Probe der wässerigen Lösung eine Reaktion auf Eisen nicht mehr gibt. Jetzt zieht man die ätherische Lösung mit 10%iger Bromwasserstoffsäure aus, bis letztere sich kaum noch anfärbt, wozu etwa 500 cm^3 der Säure in Portionen von 50 cm^3 gebraucht werden.

Im Äther verbleibt ein eisenhaltiges Produkt, das dem Lösungsmittel eine braunrote Farbe verleiht und nach seiner Zusammensetzung $C_{38} H_{44} O_6 N_4 Fe Br$ als Dimethylester eines Dihydrodimethoxybromhämins zu betrachten ist, das also nur durch Anlagerung von Bromwasserstoff und darauf folgenden Ersatz des Broms durch Methoxyl entstanden sein kann.

Die wässerige bromwasserstoffsaure Lösung läßt man dann zur Verseifung der Estermethyle vier Tage bei Z. T. stehen, worauf sie durch Natronlauge annähernd neutralisiert und dann durch Natriumazetatlösung gefällt wird. Beim Ausschütteln mit zirka 1 *l* Äther geht von der Fällung ein Teil in das Lösungsmittel, ein Teil bleibt ungelöst und sammelt sich zwischen der ätherischen und wässerigen Lösung als Mittelschicht an, die abgetrennt werden kann. Die erhaltene ätherische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und etwas mehr als die Hälfte des Äthers abdestilliert. Nach 15stündigem Stehen hat sich dann das Hämatoporphyrinderivat in dunkelrotvioletten Kristallen abgeschieden, die in der Form den *Teichmann*schen Kristallen gleichen. Sie sind in schwach erwärmtem Methylalkohol leicht löslich und beim Erkalten scheiden

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 70 (1913).

[2]) Ibid. **87**. 474 (1913).

[3]) Ibid. **94**. 181 (1915).

[4]) Was auch schon aus der Darstellung des Mesohämatins (vgl. S. 220) gefolgert werden kann.

sich feine Nadeln aus. Ganz das gleiche Verhalten zeigt auch der zunächst nicht in Äther übergegangene Anteil, der in der Mittelschicht verblieben war und durch Filtration von der wässerigen Lösung abgetrennt werden konnte.

Der Dimethyläther des Hämatoporphyrins zeigt keinen Schmelzpunkt, löst sich leicht in Azeton und in Eisessig, in Soda und Ammoniak, wobei ein Gegensatz zum Hämatoporphyrin nur zwei Moleküle der Base gebunden werden, gibt aber ein Silbersalz, das drei Atome Metall enthält. Es muß also ein Imidwasserstoffatom durch Silber vertretbar sein, in welchem Zusammenhang angeführt sei, daß die Komplexsalzbildung mit dem Äther und den Estern des Hämatoporphyrins leichter erfolgt als mit dem Hämatoporphyrin selbst. Durch Methylalkohol und Salzsäure, wie auch durch Diazomethan wird der Dimethyläther leicht verestert. Er zeigt die Salzsäurezahl 1, wird der ätherischen Lösung aber am besten durch 2%ige Salzsäure entzogen, das entstehende Dichlorhydrat ist viel leichter in Wasser löslich als das des Hämatoporphyrins. Bei längerer Einwirkung eines Überschusses von Salzsäure oder beim Stehen der Lösung des Dimethyläthers in konzentrierter Salzsäure wird ein Methyl entfernt, man erhält beim Eindunsten der Lösung neben Schwefelsäure im Vakuum rotviolette Kristalle des Dichlorhydrates eines Monomethyläthers des Hämatoporphyrins, woraus, wie auch aus dem S. 224/225 beschriebenen Versuch hervorgeht, daß die beiden Hydroxyle des Hämatoporphyrins verschiedenen Charakter aufweisen. Andererseits werden beide durch Dimethylsulfat methyliert. Eisessigbromwasserstoff führt vollständige Entmethylierung herbei.

d) Ein dem Hämatoporphyrin sehr nahe stehendes Porphyrin gewann *Willstätter* und *M. Fischer* aus dem Einwirkungsprodukt verflüssigten Chlorwasserstoffes auf Hämin. Zur Darstellung des letzteren wird eine Einschlußröhre mit 5 *g* Hämin beschickt und darin etwa die doppelte Menge Chlorwasserstoff unter Kühlung mit flüssiger Luft und Vermeidung des Luftzutrittes kondensiert. Das Hämin geht sofort mit prächtig blauroter Farbe in Lösung, wobei das grünliche Tingieren der Lösung des Hämins in Bromwasserstoff nicht zu beobachten ist. Die Röhre wird dann zugeschmolzen, wobei man wegen der Explosionsgefahr sehr vorsichtig sein muß, und nach einem Tag wieder geöffnet, nachdem sie vorher mit Kohlensäure-Äther und dann mit flüssiger Luft gekühlt worden ist. Der Chlorwasserstoff wird nun bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet, am Ende unter vermindertem Druck. Zu starkes Schäumen hiebei läßt sich vermeiden, dadurch, daß man die Röhre in ein leeres *Dewar*-Gefäß stellt. Der Rückstand (7 *g*) ist eine hygroskopische, metallglänzende, blätterige Masse von violetter Farbe. Durch methylalkoholische Kalilauge entsteht hieraus der Dimethyläther

des Hämatoporphyrins, durch Auflösen in 20%iger Salzsäure unter gelindem Erwärmen tritt Hydrolyse ein und man kann das als **Häminoporphyrin**[1]) bezeichnete Produkt nach Abfiltration einer flockigen Ausscheidung und genauer Neutralisation in Äther aufnehmen, aus welcher Lösung es sich nach geringer Konzentration als schweres, dunkelviolettes Kristallmehl abscheidet, das aus metallglänzenden, rechteckigen, an den Ecken gerundeten Blättchen besteht. Das Häminoporphyrin bildet zum Unterschied vom Hämatoporphyrin ein Trichlorhydrat und verliert im Hochvakuum bei 105° kein Wasser; über den Methylester oder durch Einwirkung von Eisessigbromwasserstoff wird es wieder in Hämatoporphyrin übergeführt, so daß es im Verein mit seiner Zusammensetzung, welche sich durch die Formel $(C_{34}H_{37}N_4O_5)_2O$ wiedergeben läßt, als ein aus zwei Molekülen Hämatoporphyrin unter Austritt eines Moleküls Wasser aus den alkoholischen Hydroxyden entstandenes Anhydrid aufgefaßt werden kann.

Aus dem durch Einwirkung verflüssigten Chlorwasserstoff auf Hämin entstandenen Produkt läßt sich endlich auch noch ein vom Hämatoporphyrin verschiedenes Porphyrin gewinnen, das von *Willstätter*[2]) als

Hämidoporphyrin $C_{33}H_{36}O_5N_4$ (?)

bezeichnet wird. Zur Darstellung löst man 2 *g* des Hexachlorides in 100 cm^3 Azeton und läßt zu der am Rückflußkühler siedenden Lösung eine Lösung von kristallisiertem Natriumazetat in Eisessig tropfen, bis die blaurote Farbe über Rot in Braun umgeschlagen und eine Trübung eingetreten ist, worauf filtriert wird. Das Filtrat wird mit viel Äther verdünnt, alle Essigsäure mit festem Natriumbikarbonat und wenig Wasser beseitigt und die mit viel Wasser gewaschene ätherische Lösung stark eingeengt. Dann kristallisiert das Hämidoporphyrin in prachtvollen großen Prismen aus, die gerade abgeschnitten sind und braunvioletten Glanz zeigen (Ausbeute 1 *g*).

Das neue Porphyrin spaltet im Hochvakuum bei 105° ein Molekül Wasser ab, löst sich in Ammoniak mit leuchtend roter und in Salzsäure mit blauvioletter Farbe.

Das Mesoporphyrin $C_{34}H_{38}O_4N_4$.

Bei dem Versuch, die durch das spektroskopisch analoge Verhalten des Hämatoporphyrins und Phylloporphyrins wahrscheinlich gemachte Verwandtschaft der eisenhaltigen Komponente

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 477 (1913).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 479.



des Blutfarbstoffes mit dem Blattfarbstoff dadurch chemisch sicher zu stellen, daß ersteres durch Reduktion in das letztere übergeführt wurde, welche Möglichkeit um so mehr aussichtsreich erschien als *Nencki* den genannten Porphyrinen die Formeln $C_{16}H_{18}O_3N_2$ und $C_{16}H_{18}ON_2$ zuschreiben zu können glaubte, bedienten sich *Nencki* und *Zaleski*[1]) zur Abspaltung des Eisens aus dem Hämin und zur Reduktion des mit Jodwasserstoff gesättigten Eisessigs. Ihr Versuch führte zwar nicht zum Phylloporphyrin, wohl aber zu einem neuen Vertreter der Porphyrine, dem sie wegen der Mittelstellung im Gehalt an Sauerstoff — die ersten Analysen führten zur Formel $C_{16}H_{18}O_2N_2$ — den Namen Mesoporphyrin gaben. *Zaleski*[2]) hat dann später die noch heute gültige Formel durch eine große Zahl von Analysen erhärtet und den Charakter des Mesoporphyrins als ein zweibasisches Porphyrin festgestellt. Zur Darstellung dieses Stoffes benützt man das Verfahren *Zaleskis* in der ihm von *H. Fischer* und *F. Meyer-Betz*[3]) gegebenen Modifikation: 5 *g* Hämin werden mit 30 cm^3 Jodwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·96) und 75 cm^3 Eisessig in einem *Erlenmeyer*-Kolben auf dem siedenden Wasserbade bis zur völligen Lösung erwärmt, was bei häufigem Umschütteln eine viertel Stunde erfordert. Jetzt wird die Lösung mit 10 cm^3 Wasser versetzt, wobei sie einen mehr rötlichen Ton annimmt, und dann werden innerhalb zehn Minuten zirka 3 *g* Phosphoniumjodid in kleinen Stückchen eingetragen, wodurch allmählich eine Aufhellung der Flüssigkeit und ein Umschlagen der Farbe aus dem anfänglich dunklen Rotgelb in Blaurot eintritt. Die Reaktion ist beendet, sobald die gelbe Nuance aus der Flüssigkeit verschwunden ist und Verdünnen des Reaktionsgemisches mit der gleichen Menge Wasser keinen Niederschlag mehr hervorruft. Ist dies der Fall, so unterbricht man die Reaktion durch Abkühlen des Gemisches und versetzt mit der gleichen Menge Wasser. Beim nun folgenden Eingießen in 1 *l* Wasser entsteht dann ein ziemlich reichlicher, rötlich flockiger Niederschlag in der blauroten Flüssigkeit. Ohne von diesem abzufiltrieren, stumpft man mit 10%iger Natronlauge bis zu essigsaurer Reaktion ab, wobei ein neuer Niederschlag entsteht, während die Flüssigkeit nur noch hellgelb gefärbt ist. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen, das klare Filtrat riecht deutlich nach Hämopyrrol (vgl. S. 270). Man löst ihn dann in 300 cm^3 1%iger Natronlauge, verdünnt auf 1000 cm^3, filtriert und fällt das Mesoporphyrin mit Essigsäure wieder aus. Der gereinigte Farbstoff wird dann wieder abgesaugt, ausgewaschen, in möglichst wenig,

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 997 (1901).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 54 (1902).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 99 (1912); **84**. 278 (1913).

stark verdünnter Natronlauge gelöst und mit einem geringen Überschuß konzentrierter Natronlauge das schwer lösliche, leuchtend rot gefärbte Natriumsalz des Mesoporphyrins gefällt. Nach halbstündigem Stehen wird abfiltriert, mit 1%iger Natronlauge ausgewaschen und Niederschlag samt Filter in einem *Erlenmeyer* mit zirka 250 *cm*³ kochender 2·5%iger Salzsäure übergossen. Von dem minimalen Rückstand und dem Filter filtriert man möglichst schnell ab, da sich sonst ein großer Teil des salzsauren Mesoporphyrins schon vorher abscheidet. Aus dem Filtrat kristallisiert es dann in feinen, verfilzten Nädelchen, die teilweise zu Kugeln vereinigt sind, frei von amorphen Flocken bezw. Schollen aus. Die Ausbeute beträgt 32% des verwendeten Hämins. Die Zusammensetzung entspricht der Formel $C_{34} H_{38} O_4 N_4$, 2 H Cl.

Aus dem salzsauren Salz gewann *Willstätter*[1]) das freie Mesoporphyrin im kristallisierten Zustande, und zwar wurde es aus ätherischer Lösung in langen Prismen, aus heißem Alkohol in spindelförmigen Kristallen erhalten, die oft Durchwachsungszwillinge bilden. Aus der ätherischen Lösung geht es am besten in 2 bis 3%ige Salzsäure über; an 0·1%ige Salzsäure wird kein Mesoporphyrin abgegeben. Das Mesoporphyrin läßt sich leicht verestern, wobei z. B. zwei Methyle eintreten, und diese Ester sind vorzüglich geeignet, Metalle in komplexe Bindung aufzunehmen, wodurch bewiesen ist, daß das Metall Imidwasserstoff ersetzt. Doch läßt sich auch aus dem Mesoporphyrin selbst Mesohämin gewinnen. Diese Einführung der Chlorferrigruppe an Stelle zweier Wasserstoffatome hat zuerst *Zaleski*[2]) ausgeführt, und die Methode ist bemerkenswert, weil das Eisen im Ferrozustand benützt wird, es muß also der Sauerstoff der Luft sogleich die Oxydation bewirken. 1 *g* kristallisiertes salzsaures Mesoporphyrin wird in 300 *cm*³ 80%iger, mit Kochsalz gesättigter Essigsäure gelöst und die Lösung auf 50 bis 70° erhitzt. Andererseits wird in einem Kölbchen metallisches Eisen unter Erwärmen in Essigsäure gelöst und diese Lösung durch ein Filter in kleinen Portionen zu der Lösung des Farbstoffes hinzugegossen. Das Erhitzen der ersten Lösung und die von Zeit zu Zeit erfolgende Zugabe von etwas Eisensalzlösung wird so lange fortgesetzt, bis die Lösung ihre Farbe ändert, d. h. bis man ein deutliches Häminspektrum erhält. Es scheiden sich dann auch aus der Lösung häminähnliche Kristalle aus. Das abfiltrierte und ausgewaschene Produkt kann nach demselben Verfahren, welches beim Hämin angewendet wird, umkristallisiert werden. Es wurde von *Zaleski* zunächst als „hydrogenisiertes Hämin" bezeichnet, ist aber zweifellos identisch mit dem durch direkte Reduktion des Hämins

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 492 bis 493 (1913).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 11 (1904).

hergestellten Mesohämin. Die essigsaure Lösung zeigt bei spektroskopischer Untersuchung das Spektrum des Hämins, nur sind sämtliche Absorptionsstreifen nach dem violetten Ende hin verschoben. Diese Verschiebung kann auch in alkalischer Lösung beider Stoffe und sogar im Spektrum der beiden Hämochromogene, welche durch Einwirkung der *Stockes*schen Reduktionsflüssigkeit gewonnen worden ist, beobachtet werden.

Zaleski gelang auch die Einführung der Manganichloridgruppe in das Mesoporphyrin, und als überraschend leicht vor sich gehend bezeichnen *H. Fischer* und *A. Hahn*[1]) die Aufnahme von Kupfer aus essigsaurer Lösung[2]). Die Herausnahme des Eisens aus dem Mesohämin durch Eisessigbromwasserstoff führt zum Mesoporphyrin; sie läßt sich auch bemerkenswerterweise durch konzentrierte Schwefelsäure bewirken. Mesohämin ist demnach beständiger als Hämin, was sich auch darin zeigt, daß das Eisen im ersteren noch fester gebunden erscheint als im Hämin[3]). Reduziert man Hämatoporphyrin in essigsaurer Lösung mit Jodwasserstoff bei Wasserbadtemperatur, so entsteht Mesoporphyrin; die alkoholischen Hydroxyle der Seitenketten im Hämatoporphyrin lassen sich also unter den angegebenen Bedingungen ohne weitere Veränderungen durch Wasserstoff ersetzen. Nun läßt sich das Hämatoporphyrin auch durch methylalkoholische Kalilauge bei höherer Temperatur reduzieren, hiebei bildet sich aber kein Mesoporphyrin, sondern eines, das ihm entweder isomer ist oder sich durch den Mindergehalt zweier Wasserstoffatome von ihm unterscheidet. *R. Willstätter*[4]), der Entdecker des neuen Porphyrins, hat ihm den Namen

Hämoporphyrin

gegeben. Zu seiner Darstellung löst man 2 *g* amorphes Hämatoporphyrin in 50 cm^3 methylalkoholischer Kalilauge und 100 cm^3 Pyridin auf und erhitzt die Lösung im Silbertiegel und Autoklaven vier bis fünf Stunden lang auf 200°. Danach hat sich fast die ganze Menge des Reaktionsproduktes als kristallinische Kaliumverbindung am Boden des Silberbechers ausgeschieden. Man löst sie nach Dekantieren des Pyridins in Wasser auf und fällt das freie Hämoporphyrin durch Ansäuern mit Essigsäure aus. (Ausbeute 1·8 *g*). Zur Reinigung wird das Rohprodukt in verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung mit Ammoniak neutralisiert und das Porphyrin in ätherische Lösung gebracht, die nunmehr mit 0·1%iger Salzsäure

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 182 (1914).

[2]) Schwerer gelingt die Einführung des Magnesiums. *J. Zaleski*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 1687 (1913).

[3]) *W. Küster*: Ibid. **88**. 377 (1913).

[4]) Ibid. **87**. 484 (1913).

gewaschen wird, worauf das Porphyrin durch 2 bis 3%ige Salzsäure extrahiert und die salzsaure Lösung durch Ausschütteln mit Äther von einer gelben Beimischung befreit wird. Nach abermaliger Neutralisation mit Ammoniak wird dann das Porphyrin wieder in Äther überführt und beim Einengen der wasserhaltigen ätherischen Lösung in feinen, oft haarförmigen rotbraunen Nadeln erhalten. Aus trockenem Äther scheidet es sich in braunen Aggregaten von dicken Platten ab, neben denen gut ausgebildete rhombenförmige Täfelchen erscheinen. In absolutem Alkohol ist das Hämoporphyrin schwer löslich, beim Kochen löst es sich beträchtlich, scheidet sich aber beim Erkalten nur unvollständig wieder ab. In Eisessig ist es mit stark blaustichig roter Farbe löslich, in Chloroform und Benzol ist es kaum löslich.

Hämoporphyrin ist zweibasisch, der Dimethylester, in Äther löslich, kristallisiert in schief abgeschnittenen Prismen mit häufigen Zwillingsbildungen.

Vom Mesoporphyrin unterscheidet es sich durch stärker basische Eigenschaften, die Salzsäurezahl ist 0·75, für ersteres 1·5; auch ist das salzsaure Salz leichter löslich als das des Mesoporphyrins und kristallisiert aus der Lösung in 5- bis 20%iger Salzsäure erst nach längerem Stehen in schönen Nadeln aus.

Das Hämoporphyrin oder besser noch das aus ihm erhältliche Hämophyllin, d. h. sein komplexes Magnesiumsalz, verliert nun unter bestimmten Bedingungen zwei Moleküle Kohlendioxyd oder bei Annahme der Formel mit 34 Kohlenstoffatomen ein Molekül Kohlendioxyd und ein Molekül Essigsäure[1]) und liefert dadurch ein Porphyrin, das keine sauren Eigenschaften mehr besitzt, wohl aber noch imstande ist, komplexe Salze zu bilden. Es ist identisch mit dem aus Porphyrinen, die sich vom Blattfarbstoff ableiten, durch Abgabe von Kohlendioxyd erhaltenen Produkt, das von *Willstätter*[2]) entdeckt und als

Ätioporphyrin

bezeichnet worden ist, und beansprucht als gemeinsames Abbauprodukt der beiden wichtigen Farbstoffe besondere Bedeutung. Die Zusammensetzung wird durch die Formel $C_{31}H_{36}N_4$ wiedergegeben.

Zur Gewinnung des Hämophyllins werden 6 *g* Hämatoporphyrin mit 90 *cm*³ methylalkoholischer Kalilauge, 160 *cm*³ Pyridin und 2 *g* Magnesiumoxyd im Autoklaven auf 190° viereinhalb Stunden

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Über die Destillation einiger Pyrrolkarbonsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 186 (1914).

[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **396**. 186 (1913); **400**. 182 (1913); Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 494 (1913).

lang erhitzt. Nach dem Erkalten wird die alkalische Flüssigkeit zur Entfernung des Pyridins mit 500 cm^3 Äther versetzt und die ausgefällte alkalische Schicht wiederholt mit Äther gewaschen; dann wird sie mit 200 cm^3 Wasser verdünnt, wodurch das Kaliumsalz des Phyllins in hellroten Flocken vollständig ausfällt. Beim Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter sammeln sie sich an der Grenzschicht und lassen sich nach dem Ablassen der Lauge, die ein braunes Nebenprodukt entfernt, vom Äther abfiltrieren. Die Ausbeute an dieser Kaliumverbindung beträgt 8 *g*; aus ihr läßt sich das Phyllin durch primäres Phosphat freimachen, es geht in Äther mit fuchsinroter Farbe und kann aus dieser stark fluoreszierenden Lösung kristallisiert gewonnen werden. Durch Säuren verliert das Phyllin sein Magnesium und geht also leicht in das Hämoporphyrin über.

Darstellung des Ätiophyllins. Vom Hämophyllinkalium werden je 1 *g* mit 5 *g* reinem, eisenfreiem Natronkalk in einer Porzellanschale gründlich gemischt und dieses Gemisch in vielen kleinen Portionen im Reagierrohr rasch und vorsichtig über einer kleinen Flamme erhitzt, wobei durch Bewegen das Anhaften der Substanz an der Glaswand zu verhüten ist. Beim Eintritt eines Farbwechsels von Hellgrau in Braun ist das Erhitzen sofort zu unterbrechen. Nach dem Anfeuchten der alkalischen Masse kann das gebildete Phyllin in Äther überführt werden, die Lösung sieht braunrot aus und enthält Beimengungen, die sich durch Ausschütteln mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge und mit 4%iger Salzsäure entfernen lassen. Die weitere Reinigung erfolgt nach starker Konzentration der ätherischen Lösung durch Zusatz eines großen Überschusses an Petroläther, wobei sofort Flocken eines amorphen Nebenproduktes ausfallen, deren Menge sich beim Stehen noch vermehrt. Nach wiederholter derartiger Behandlung erscheint dann die Lösung violettrot mit roter Fluoreszenz. In dieser petrolätherischen Lösung wird das Ätiophyllin schon beim Schütteln mit 0·1%iger Salzsäure zerlegt, während dieser Stoff in ätherischer Lösung auch gegen höher konzentrierte Salzsäure beständig ist. Das unter Wegnahme des Magnesiums gebildete Ätioporphyrin bleibt mit Bronzefarbe im Petroläther und kann diesem durch 6%ige Salzsäure entzogen werden. Um es kristallisiert zu erhalten, neutralisiert man die salzsaure Lösung und schüttelt mit Äther aus. Diese ätherische Lösung wird dann rasch auf 100 cm^3 verdampft, wonach das Ätioporphyrin in schönen, einheitlichen, glänzenden spitzen Prismen auskristallisiert. Die Ausbeute beträgt zirka 3% des verwendeten Hämatoporphyrins. Das Ätioporphyrin ist in Alkohol und Petroläther schwer, in Eisessig leicht löslich mit prächtig blauroter Farbe, während die ätherische Lösung bronzerot ist. Das Pulver hat die Farbe von Alizarin auf Chrombeize.

Es schmilzt allmählich unter Zersetzung bei 265°, etwas tiefer als ein Präparat aus Phylloporphyrin, das bei 280° schmilzt.

Das Absorptionsspektrum der ätherischen Lösung (ein Tausendstel Molekül in 10 *l*) zeigt hauptsächlich vier starke Bänder; ein besonders dunkles und scharfes liegt im Blau, ein anderes breites im Grün, ein eigentümlich gegliedertes in der gelbgrünen Region und im Orange ein schmales Band, dem gegen Gelb hin ein Schatten folgt.

In das Ätioporphyrin läßt sich in eisessigsaurer Lösung mit Hilfe von Ferrichlorid, aber nur unter Zusatz von Natriumazetat, die Chlorferrigruppe einführen. Im Gegensatz zum Porphyrin sind die basischen Eigenschaften des Ätiohämins sehr schwach ausgeprägt. Noch gegen 20%ige Salzsäure ist es indifferent; erst noch stärkere Salzsäure nimmt die komplexe Verbindung ohne Abspaltung des Eisens auf. Ihre ätherische Lösung reagiert mit Alkali sofort, sie wird braun und nimmt intensives gelbes Tingieren an, was dadurch bedingt sein dürfte, daß das Chlor der Ferrigruppe durch Hydroxyl ersetzt worden ist.

Als wichtige Derivate des Mesoporphyrins in bezug auf seine Konstitution und damit auf die des Hämins seien das Tetrachlor- und das Tetrabrommesoporphyrin beschrieben, die unzweifelhaft als Substitutionsprodukte anzusehen sind. Zur Darstellung lösen *H. Fischer* und *H. Röse*[1]) 2 *g* Mesoporphyrin in 80 cm^3 heißem Eisessig und geben nach Abkühlung auf Z. T. ein Gemisch von 86 cm^3 rauchender Salzsäure und 14 cm^3 3%iger Wassersuperoxydlösung nicht allzu schnell dazu. Schon nach kurzer Zeit tritt ein Farbenumschlag nach Grün ein und allmählich verschwindet die rote Farbe vollständig und macht in zirka vier Stunden einer rein grasgrünen Platz, worauf durch einen Überschuß von Wasser das salzsaure Salz des Reaktionsproduktes in grünen, einheitlich kristallisierenden Nadeln abgeschieden werden kann. (Die Abscheidung ist evetnuell amorph, doch gelingt es durch Impfen stets, den Farbstoff sofort kristallisiert zu erhalten.) Nach dem Absaugen und Waschen mit 2·5%iger Salzsäure wird die Ausbeute, etwa 2 *g*, in 30 cm^3 Eisessig und 30 cm^3 25%iger Salzsäure gelöst, die Lösung filtriert und zunächst zirka 50 cm^3 Wasser hinzugegeben; hat dann die Kristallisation einmal begonnen, so kann weiterer Zusatz von Wasser bis zur totalen Ausfällung erfolgen, ohne daß eine amorphe Ausscheidung eintritt. Zur Analyse wird das äußerst hygroskopische Salz über Chlorkalzium und Kaliumhydroxyd getrocknet; sie führt zur Formel $C_{34} H_{36} O_4 N_4 Ce_6$. Allem Anschein nach liegt also das Dichlorhydrat eines Tetra-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 2461 (1913).



chlormesoporphyrins vor, das allerdings schon beim Trocknen im Vakuum ein Molekül Chlorwasserstoff verliert und bei 100° ein weiteres Molekül abgibt, worauf durch Natronlauge zwei Chloratome herausgenommen werden, während das intakte Salz außer zwei Molekülen Salzsäure nur wenig Chlor durch das genannte Reagens verliert, aber doch so viel, daß die freie Basis nicht im reinen Zustande isoliert werden konnte. Da aber durch Reduktion mit Jodwasserstoff sowohl wie mit Natriummethylat Mesoporphyrin regeneriert werden konnte und bei der Darstellung durch Einleiten von Chlor in die Eisessiglösung sich reichliche Mengen von Chlorwasserstoff entwickeln, kann nichts anderes als ein Substitutionsprodukt des Mesoporphyrins vorliegen, um so mehr als ein Additionsprodukt wohl farblos sein müßte. Auch wird die Farbe nicht etwa durch noch vorhandenes Mesoporphyrin beeinflußt, denn das Spektrum des salzsauren Salzes zeigt einen ganz schwachen Streifen im Gelb, der auf Zusatz von wenig Salzsäure nahezu verschwindet, während nunmehr im Rot ein ganz feiner Streifen bemerkbar wird. Aus der Existenz des Tetrachlormesoporphyrins folgt also, daß vier von seinen Wasserstoffatomen in besonderer und gleichartiger Stellung sich befinden müssen, was für das Vorhandensein von vier Methingruppen spricht, worauf zurückzukommen sein wird. Hier sei noch erwähnt, daß auch ein prachtvoll kristallisierendes Brommesoporphyrin dadurch erhalten werden kann, daß man z. B. 1 *g* Mesoporphyrin in 40 cm^3 Eisessig und 30 cm^3 Bromwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·38) auflöst und die Lösung mit 1·1 *g* Brom, in 10 cm^3 Eisessig gelöst, versetzt, worauf sich innerhalb zwölf Stunden das bromierte Derivat vollständig abscheidet. Leider verliert es langsam, aber ständig Bromwasserstoff, so daß die Analysen keinen sicheren Anhaltspunkt für die Formulierung geben, doch liegt wahrscheinlich ein Tetrabrommesoporphyrin vor (*H. Fischer* und *A. Hahn*[1]).

Die Leukoverbindungen der Porphyrine.

Es war bereits erwähnt worden (S. 219), daß das Häminmolekül je zwei ihrer Natur nach gleichwertige ungesättigte Stellen aufweist, die zu ihrer Sättigung 2 × (2 + 2) Wasserstoffatome erfordern. Genau das gleiche Verhalten wird das bisher unbekannte Porphyrin des Hämins ($C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl \rightarrow C_{34}H_{34}O_4N_4$) aufweisen, für welches der Name „Porphyrin" reserviert bleiben sollte. Die bis jetzt bekannten Porphyrine haben in den ungesättigten Seitenketten bereits Wasserstoff (Meso-, Hämoporphyrin) oder die Elemente des Wassers (Hämatoporphyrin) addiert. Mit Absättigung des zweiten Paares der ungesättigten Stellen tritt dann

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 174 (1914).

Farblosigkeit auf, die entstandenen Leukoverbindungen werden aber schon durch den Luftsauerstoff wieder zum Farbstoff oxydiert[1]). Die am besten bekannte Leukoverbindung ist das zum Mesoporphyrin gehörige Mesoporphyrinogen, und von ihr wissen wir, daß sie nicht imstande ist, Metalle komplex zu binden[2]). Es ist anzunehmen, daß sich diese wichtige Änderung der Eigenschaften beim Übergang sämtlicher Porphyrine in ihre Leukoverbindungen einstellen wird.

Beim Hämin kann man nun mit der Möglichkeit rechnen, daß unter bestimmten Bedingungen von den beiden ungesättigten Stellen des Moleküls nur das zweite Paar bei der Reduktion betroffen wird, dann muß eine Leukoverbindung entstehen, die dem Porphyrin des Hämins entspricht, d. h. es muß zu gleicher Zeit mit der Reduktion das Eisen entfernt werden. In der Tat fand nun *H. Fischer*[3]), daß Hämin, mit Natriumamalgam behandelt, in eine Leukoverbindung übergeht, die sich an der Luft schnell rot färbt; beim Ansäuern erhält man das typische saure Porphyrinspektrum, macht man alkalisch, so entsteht das alkalische Porphyrinspektrum erst nach einiger Zeit. Es ist also sicher, daß das Eisen abgespalten worden ist. Im reinen Zustande wurde das Leukoporphyrin nicht erhalten, daß die Seitenketten aber nicht reduziert worden waren, geht mit Sicherheit aus dem Befund bei der Oxydation hervor, wonach Methyläthylmaleinimid, das sich unter gleichen Bedingungen sowohl aus Meso- wie aus Hämoporphyrin erhalten läßt, hier nicht gefaßt werden konnte (vgl. S. 257). Dieses Resultat zeigt, daß die Abspaltung des Eisens und die Reduktion der Seitenketten nicht Hand in Hand zu gehen brauchen. Reduziert man aber das Hämin durch Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium, so wird es auch in den ungesättigten Seitenketten reduziert (*H. Fischer* und *A. Hahn*[4]).

1·5 *g* Hämin werden in 50 *cm*³ n/10-Natronlauge gelöst, darauf mit 0·2 *g* Palladium, gelöst in 8 *cm*³ Wasser und 1 *cm*³ n/10-Natronlauge, versetzt und die Lösung in eine Saugflasche gefüllt, die Luft in derselben durch Wasserstoff vertrieben, sodann die Flasche vorn verschlossen, die Verbindung mit dem *Kipp*schen Apparat dagegen während der ganzen Versuchsdauer aufrecht erhalten. Die Saugflasche wird über Nacht geschüttelt und am anderen Morgen ihr Inhalt mit konzentrierter Salzsäure gefällt, der Niederschlag abgesaugt, ausgewaschen und sodann in 75 *cm*³ n/10-Natron-

---

[1]) *Zaleski*: Chem. Zentralbl. **1907**/I. 1499.

[2]) *H. Fischer, E. Bartholomäus* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 511; Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**. 262 (1913).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 227 (1911).

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 181 (1914).

lauge gelöst und mit 30 *g* Bleidioxyd und 75 *cm*³ 50%iger Schwefelsäure oxydiert, wobei Hämatinsäure und Methyläthylmaleinimid erhalten werden (vgl. S. 257).

Die Reduktion des Hämatoporphyrins zu seiner Leukobase und die Rückoxydation der letzteren zu kristallisiertem Hämatoporphyrin läßt sich durch folgenden Versuch demonstrieren[1]):

5 *g* Hämatoporphyrin werden in 400 *cm*³ Wasser unter Zusatz von 100 *cm*³ Natronlauge gelöst und mit 100 *g* 3%igem Natriumamalgam bis zur Farblosigkeit geschüttelt. Dann wird vom Quecksilber getrennt und vier Tage lang ein kräftiger Luftstrom durch die Lösung gesaugt. Nach dieser Zeit hat sich eine beträchtliche Menge eines Natronsalzes abgeschieden, die durch Zusatz von 30 *cm*³ konzentrierter Natronlauge noch vermehrt wird. Nach Abfiltration und Auswaschen mit verdünnter Lauge wird das Natronsalz mit kalter 2·5%iger Salzsäure zersetzt und die erhaltene Lösung schnell filtriert; nach kurzer Zeit scheiden sich dann aus ihr 1·45 *g* durchaus einheitlich kristallisierendes salzsaures Hämatoporphyrin ab.

Das Mesoporphyrinogen

wird am zweckmäßigsten direkt aus Hämin dargestellt (*H. Fischer*[2]). 5 *g* Hämin, 5 *g* Phosphoniumjodid, 50 *cm*³ Eisessig und 25 *cm*³ Jodwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·96) werden im zugeschmolzenen Rohr geschüttelt, wobei nach kurzer Zeit Lösung unter Auftreten des sauren Porphyrinspektrums erfolgt. Nach einigen Tagen wird der Röhreninhalt gelbstichig und nach zehn bis elf Tagen ist die ursprünglich tief rote Lösung durchsichtig und nur noch schwach braun gefärbt. Jetzt wird die Röhre geöffnet und der Inhalt in die sechsfache Menge Wasser gegossen, wobei eine milchige Trübung entsteht. Durch Zusatz von 65 *cm*³ 33%iger Natronlauge verschwindet die Reaktion auf Kongorot und der durch fünfmaliges Ausschütteln erhaltene, filtrierte und mit Natriumsulfat oberflächlich getrocknete Chloroformextrakt wird in 400 *cm*³ niedrig siedenden Petroläther gegossen. Von dem sich flockig abscheidenden, schwach jodhaltigen Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Es hinterbleibt eine schwach rötlich gefärbte Substanz in kugeligen Kristallaggregaten, die durch zweimaliges Auswaschen mit Äther nahezu farblos wird, in einer Ausbeute bis zu 38% der theoretisch berechneten Menge. Zur völligen Reinigung wird aus Methylalkohol umkristallisiert. So wird das Mesoporphyrinogen in derben Prismen erhalten, die keinen scharfen Schmelzpunkt besitzen, vielmehr tritt von 190° ab Sintern unter anscheinender

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**. 18 (1913).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 512; Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**. 270 (1913).

Zersetzung auf. Es ist schwer löslich in Wasser, Äther, Petroläther, Benzol und Chloroform, in Methyl- und Äthylalkohol ist es mäßig, in Azeton leicht löslich. Zur Analyse trocknet man bei 60° im Vakuum über Phosphorpentoxyd und erhält Werte, aus denen sich die Zusammensetzung $C_{34}H_{42}O_4N_4$ ergibt und die auch dem Molekulargewicht entspricht. Vom Porphyrin des Hämins unterscheidet sich also das Mesoporphyrinogen durch ein Mehr von acht, vom Mesoporphyrin durch vier Wasserstoffatome. Die letzteren werden an der Luft wieder fortoxydiert, die Substanz ist also sehr luft- und lichtempfindlich, besonders in saurer Lösung, doch ist sie nur in konzentrierter Salzsäure leicht löslich, wobei sofort Rotfärbung eintritt. So ist die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion zwar negativ, doch entsteht natürlich auch hier sehr schnell eine Rotfärbung. In alkalischer Lösung führt die Luftoxydation zum Mesoporphyrin zurück, wozu noch zu bemerken ist, daß das Mesoporphyrinogen sich in Soda ohne sichtbare Entwicklung von Kohlensäure löst, daß es in Natriumbikarbonat kaum löslich und daß das Natriumsalz schwer löslich ist. Die alkoholische Lösung des Mesoporphyrinogens reagiert fast neutral (Phenolphthalein); hier gleichen sich also die sauren und die basischen Eigenschaften nahezu aus.

Mesoporphyrinogen kann auch aus Hämato- und Mesoporphyrin durch Reduktion mit Jodwasserstoff erhalten werden, besser noch aus letzterem durch Natriumamalgam oder durch Zinkstaub-Eisen in alkalischer Lösung.

Die mangelhaften Ausbeuten bei der geschilderten Darstellung erklären sich dadurch, daß Nebenprodukte auftreten, deren Entstehen mit der Aufspaltung des Häminmoleküls zusammenhängt.

Urin- und Kotporphyrin[1]).

Den Porphyrinen kommt auch in physiologischer bezw. pathologischer Hinsicht ganz besondere Bedeutung zu. Daß nach der Einverleibung bestimmter Arzneimittel (Sulfonal) ein Farbstoff im Harn auftreten kann, ist schon lange bekannt; man sprach ihn als Hämatoporphyrin an, weil das spektroskopische Verhalten auf dieses einst allein bekannte Porphyrin hinwies, und weil man ferner in Ermangelung von Methoden zur Reindarstellung eine sichere analytische Kontrolle nicht ausführen konnte, bürgerte

[1]) Die Angaben im Text sind folgenden Arbeiten *H. Fischers* entnommen: *a*) Über das Urinporphyrin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**. 34 (1915); *b*) Über das Kotporphyrin. Ibid. **96**. 148 (1915); *c*) *H. Fischer* und *G. A. v. Kemnitz*: Über die Einwirkung einiger Porphyrine auf Paramäzien. Ibid. **96**. 309 (1916); *d*) Über die Giftigkeit, die sensibilisierende Wirkung und das spektroskopische Verhalten der natürlichen Porphyrine. ibid. **97**. 109 (1916); *e*) Beobachtungen am frischen Harn und Kot von Porphyrinpatienten. Ibid. **97**. 148 (1916).



sich diese Vorstellung ein, und man sprach also nur von einer Hämatoporphyrinurie und übertrug diese Bezeichnung auch auf eine Erkrankung besonderer Art, die unabhängig von Arzneimitteln hier und da beobachtet worden war. Endlich wurde festgestellt, daß die Beschreibung der im Harn aufgefundenen Farbstoffe auf das Vorhandensein eines Porphyrins hinwies in einigen Fällen, bei denen der Erkrankung ganz andere Ursachen zugrunde gelegt und die daher mit entsprechenden Namen bezeichnet worden waren. Dann wurde von *Hausmann* die Zugehörigkeit des Hämatoporphyrins zur Klasse der sensibilisierend wirkenden Farbstoffe nachgewiesen, nachdem solche Eigenschaften an künstlichen Farbstoffen, z. B. am Eosin, von *Tappeiner* und *Raab* dargetan worden waren. Eine diesbezügliche Wirkung des Hämatoporphyrins für den Menschen ging schließlich aus einem Versuch hervor, welchen *Dr. Meyer-Betz* an sich selbst vornahm, während z. B. Mesoporphyrin zwar auf Infusorien stärker als Hämatoporphyrin wirkte, bei höheren Tieren aber weit weniger wirksam war.

So war es von größter Wichtigkeit, festzustellen, welches der beiden Porphyrine im Harn und eventuell im Kot auftrat. Glücklicherweise konnte *H. Fischer* einen Patienten erhalten, der an ausgesprochener Porphyrinurie, verbunden mit Lichtempfindlichkeit, erkrankt war und dauernd Farbstoff in seinen Harn ausschied. Es gelang dann *H. Fischer* in kurzer Zeit, den Farbstoff, oder vielmehr die Farbstoffe des Urins und des Kotes dieses Patienten zu isolieren und im reinen, kristallinischen Zustande zu gewinnen, und überraschenderweise stellte sich nun heraus, daß es sich zwar um Porphyrine mit allen dieser Klasse zugehörenden Eigenschaften handelte, daß es aber höher basische Stoffe waren, denn das Urinporphyrin konnte als eine siebenbasische, das Kotporphyrin als eine dreibasische Säure identifiziert werden, und das Vorhandensein eines vierbasischen Porphyrins wurde wahrscheinlich gemacht. Auch ging aus Stoffwechselversuchen hervor, daß das Urinporphyrin als Endprodukt einer biochemischen Synthese anzusehen ist, und die chemischen Umwandlungen ließen keinen Zweifel, daß es sich um Abkömmlinge der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes handelte, die also karboxyliert worden waren, um sie zu entgiften, eine bisher nicht beobachtete biochemische Reaktion. Denn das Urinporphyrin erwies sich als harnfähig, durch die Karboxylierung wurde also die Ausscheidung der anormalen, durch eine Stoffwechselanomalie entstandenen Stoffe begünstigt, und die Entgiftung wurde weitergeführt durch Reduktion zu den Leukoverbindungen[1]), die

[1]) Ob die zwar noch nicht festgestellte, aber sicher vorhandene Unfähigkeit der Leukoverbindungen zur Bildung komplexer Salze mit ihrer Ungiftigkeit zusammenhängt, ist noch nicht Gegenstand einer Erörterung geworden.

weniger oder gar nicht sensibilisierend wirken. Die Anomalie besteht aber allem Anschein nach darin, daß die Porphyrine an Stelle des Bilirubins auftreten, und diese Deutung findet gegenüber der Möglichkeit, daß die neuen Porphyrine anormale Stoffe auf dem Wege zur Bildung der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes vorstellen, eine Stärkung dadurch, daß auch nach Eingabe von Trional ihr Auftreten wahrscheinlich gemacht werden konnte (*A. Ellinger*[1]).

Isolierung des Urinporphyrins.

Spuren von Porphyrin kommen physiologisch im menschlichen Harn vor, unter pathologischen Verhältnissen kann die Porphyrinausscheidung einen solchen Grad annehmen, daß der Urin eine burgunderrote Farbe besitzt. Es können aber auch die Leukoverbindungen der Porphyrine im Harn enthalten sein, er ist dann nicht sichtbar gefärbt, gibt aber mit Zinkazetat in alkoholischer Lösung (*Schlesinger*s Reagens) fluoreszierende Lösungen mit scheinbar charakteristischem spektroskopischen Befund, wie man ihn beim Vorhandensein von Mesobilirubinogen erhält. Hiedurch wird also der Anschein erweckt, daß Urobilin, das ja von der Oxydation des Mesobilirubinogens herrührt, vorhanden sei. Das sogenannte Urobilin stammt also von zwei verschiedenen Vorstufen her, die chemisch und auch klinisch scharf auseinanderzuhalten sind, zu welchen Vorstufen sich übrigens noch zahlreiche einfacher zusammengesetzte Pyrrolderivate gesellen. Hier kann nun die *Ehrlich*sche Probe unterscheiden, welches Urobilinogen vorliegt, denn bei den Leukoverbindungen der Porphyrine ist sie negativ, d. h. es entsteht zwar eine Rotfärbung, die aber durch die Bildung des Porphyrins bedingt ist, wie man sich durch die spektroskopische Beobachtung und das Verhalten beim Alkalisieren überzeugen kann, während bei Mesobilirubinogen die *Ehrlich*sche Probe intensiv positiv ausfällt[2]) (vgl. S. 341).

Für die Gewinnung des Urinporphyrins in Form des kristallisierten Methylesters scheint es nach den bisher gesammelten Erfahrungen gleichgültig zu sein, ob der Harn sich in ammoniakalischer Gärung befindet oder nicht, nur die Nebenprodukte sind nicht identisch.

25 *l* filtrierter Urin, der keine nachweisbare Menge Eiweiß enthält, werden mit einem Überschuß an Eisessig versetzt. Beim unzersetzten Urin sind für 8 *l* Harn 100 cm^3 Eisessig nötig, beim zersetzten die doppelte Menge. Über Nacht fällt das Porphyrin in Flocken aus, die sich teils an den Boden setzen, teils an der Oberfläche schwimmen. Die dazwischen befindliche klare Flüssigkeit

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 1 (1917).

[2]) *Hans Fischer*: Münch. med. Wochenschr. **1916**. Nr. 11. S. 377.

zeigt das Porphyrinspektrum nur noch angedeutet, enthält aber noch Leukoverbindung, so daß sich die Verarbeitung lohnt. Sie wird abgehebert[1]) und der Niederschlag auf einem mit Kieselgur beschickten Filter auf einer großen Steinzeugnutsche abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und dann das Filter ein bis zwei Stunden zum Trocknen aufgestellt. Völliges Eintrocknen des Niederschlages ist zu vermeiden, da die jetzt folgende Auflösung in Natronlauge sonst viel Zeit in Anspruch nimmt. Der Gesamtniederschlag wird in 40 cm^3 n-Natronlauge und 1 *l* Wasser gelöst, die Lösung filtriert und mit Essigsäure unter Vermeidung eines größeren Überschusses gefällt, der Niederschlag auf gehärtetem Filter abgesaugt und vollkommen ausgewaschen. Die Ausbeute aus 25 *l* Harn beträgt 12 *g* feuchtes Material = 6 *g* im trockenen Zustande; es ist noch stark verunreinigt, enthält unter anderem Schwefel, und so wird das in ihm enthaltene Porphyrin am besten in den z. B. in Chloroform leicht löslichen Methylester übergeführt. Hiezu ist es zweckmäßig, das Material nicht völlig eintrocknen zu lassen, sondern noch feucht zu verarbeiten. Der Niederschlag wird demgemäß mit zirka 300 cm^3 Methylalkohol übergossen und dieser unter guter Eiskühlung mit trockenem Chlorwasserstoffgas gesättigt. Man läßt unter öfterem Umschütteln 24 Stunden stehen, verdünnt dann mit der gleichen Menge Methylalkohol und filtriert vom ungelösten Rückstand, der trocken 2·7 *g* wiegt, ab[2]). Das Filtrat wird in das mehrfache Volumen Wasser gegossen und unter Eiskühlung mit Soda alkalisch gemacht, worauf mit Chloroform extrahiert wird, welches Lösungsmittel den gesamten Farbstoff aufnimmt, ein Beweis dafür, daß die Veresterung unter den angewandten Bedingungen vollkommen geworden ist. Der Chloroformextrakt wird getrocknet und dann im Vakuum zur Trockne gebracht, wobei ein kristallisierender Rückstand im Betrage von 3 *g* erhalten wird. Zur Reinigung wird er in zirka 70 cm^3 Chloroform gelöst, die Lösung filtriert, erwärmt und kochender Methylalkohol zugegeben, worauf alsbald der Methylester in konzentrisch vereinigten Nadeln herauskristallisier und abgesaugt werden kann. Die Mutterlauge ist stark gefärbt und enthält den Ester des Kotporphyrins[3]).

[1]) Durch Fällung mit 20%iger Bariumchloridlösung — ein Liter auf je 10 *l* — entsteht ein Niederschlag, der abgesaugt, ausgewaschen und noch feucht mit Methylalkohol, der mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt ist, angesetzt wird. Dieser färbt sich alsbald tiefrot. Nach 24stündigem Stehen unter häufigem Umschütteln wird mit Methylalkohol verdünnt, die Lösung abgesaugt, der Rückstand mit Methylalkohol gewaschen und das Gesamtfiltrat in der im Text beschriebenen Weise auf den Methylester des Urinporphyrins verarbeitet. Er wurde in einer Ausbeute von 1·1 *g* erhalten.

[2]) Bei diesem Rückstand handelt es sich um einen Eiweißstoff.

[3]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**. 165 (1915). Daneben wurde auch ein Ester erhalten, der scharf bei 240° schmolz und auch den Resultaten der *Zeisel*-Bestimmung einem Porphyrin entspricht, das vier Karboxyle enthält.

Außer dem Methyl- wurde auch der Äthylester des Urinporphyrins im kristallisierten Zustande aus einer Mischung von Chloroform und Äthylalkohol gewonnen; er ist ebenso wie jener in allen Lösungsmitteln, ausgenommen Chloroform, kalt sehr schwer löslich, heißer Alkohol löst etwas, heißer Eisessig leicht. Alle Lösungen fluoreszieren tiefrot. Der Schmelzpunkt des Methylesters liegt bei 290° unter Zersetzung, der des Äthylesters bei 220°. Aus den Elementaranalysen folgt für jenen eine Zusammensetzung, welche die Formel $C_{47} H_{50} O_{16} N_4$ zum Ausdruck bringt, für diesen die Formel $C_{54} H_{64} O_{16} N_4$. Beide Formeln entsprechen auch dem Molekulargewicht. Aus ihnen geht schon hervor, daß es sich beim Urinporphyrin um eine siebenbasische Säure handeln muß, was durch die Bestimmung der Methoxyl- bezw. Äthoxylzahl nach *Zeisels* Methode bestätigt wurde. Beim Äthylester wurde endlich optische Inaktivität festgestellt.

Wie die Ester des Mesoporphyrins außerordentlich leicht Metalle komplex binden, so wurde das gleiche Vermögen beim Urinporphyrinmethylester festgestellt. Das komplexe Kupfersalz desselben, $C_{47} H_{48} O_{16} N_4 Cu$, entsteht beim Zusammengießen der Lösung des Esters in Eisessig mit einer Eisessiglösung von Kupferazetat; es kristallisiert in feinen, verfilzten, hellroten Nadeln, löst sich in Pyridin und läßt sich durch Eintragen dieser Lösung in Eisessig umkristallisieren. Das Spektrum der Pyridinlösung weist nur zwei Streifen auf. Zur Darstellung des komplexen Eisensalzes, $C_{47} H_{48} O_{16} N_4 Fe Cl$, werden 0·5 *g* Methylester in Eisessig gelöst und die Lösung mit 1 *cm*³ gesättigter Kochsalzlösung und 0·1 *g* Eisen, gelöst in Eisessig, auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Aus konzentrierter Lösung kristallisiert dann das Eisensalz über Nacht in derben Prismen heraus. Ist dies nicht der Fall, so muß man Eisessig bis zur beginnenden Kristallisation verdunsten. Man saugt dann ab und wäscht mit Wasser aus, löst nach dem Trocknen in Chloroform und setzt Alkohol und Äther hinzu, wonach 0·4 *g* kristallisiert zur Abscheidung kommen. Die Substanz sintert, im Kapillarröhrchen erhitzt, von 230° ab, ohne richtig zu schmelzen; gegen 280° tritt totale Zersetzung ein. Das Spektrum in Pyridinlösung ist dem des Hämins sehr ähnlich, nur sind die Streifen verschoben. Die Verseifung des Methylesters kann in saurer oder in alkalischer Lösung erfolgen.

0·5 *g* werden mit 30 *cm*³ Eisessigbromwasserstoff eine Stunde lang geschüttelt, wonach vollkommene Lösung eingetreten ist. Man gießt in viel Wasser und versetzt mit Natriumazetat, wobei ein blauvioletter Niederschlag ausfällt, der abgesaugt und mit Wasser vollkommen ausgewaschen wird. Das so erhaltene Präparat von Urinporphyrin muß in Natriumbikarbonat restlos löslich sein, und läßt sich dann durch vorsichtigen Zusatz von Eisessig in feinen,

mikroskopischen Nadeln erhalten, besser kristallisiert es aus Pyridin-Alkohol, enthält dann aber ein halbes Molekül Pyridin, und besonders schön aus Eisessig. Die saure Lösung weist drei, die alkalische vier Streifen im Spektrum auf. Die Zusammensetzung des freien Urinporphyrins wird durch die Formel $C_{40}\ H_{36}\ O_{16}\ N_4$ zum Ausdruck gebracht.

Isolierung des Kotporphyrins.

In allen Fällen von Porphyrinurine dürfte nach *H. Fischer* auch in Kot Porphyrin vorhanden sein, nur kann bei oberflächlicher Untersuchung der Gehalt zu Porphyrin leicht übersehen werden. Der frische Kot sieht nämlich fast wie normaler aus, und erst beim längeren Liegen an der Luft und am Licht tritt Rotfärbung, zum Schluß Schwarzfärbung auf. Zieht man die Exkremente mit Alkohol oder Äther aus, so beobachtet man das Porphyrinspektrum höchstens angedeutet, so schwach, daß es dem ungeübten Beobachter leicht entgehen kann. Arbeitet man dagegen mit Alkohol, der mit Salzsäure gesättigt ist, so tritt sofort intensive Rotfärbung mit dem charakteristischen Spektralbefund auf. Mit dieser Methode gelingt es leicht und sicher, auch recht geringe Mengen von Porphyrin im Stuhl aufzufinden, z. B. schon beim Vorhandensein von wenigen Milligrammen in einer Entleerung. Schon in einem bohnengroßen Stück einer solchen kann man deutlich beim Versetzen mit Alkoholsalzsäure die Rotfärbung mit dem typischen spektroskopischen Befund beobachten. Zur Darstellung des Kotporphyrins werden 15 Stühle auf dem Wasserbade in einer Porzellanschale getrocknet und fein gepulvert (unter dem Abzug, Atmen durch ein Baumwollfilter!) Das Pulver wird dann in Papierhülsen gebracht und 24 Stunden lang mit Äther extrahiert, wodurch alle störenden Stoffe, wie Fett, Cholesterin, „Urobilin", Phosphatide, Gallensäuren, entfernt werden, während fast kein Farbstoff weggenommen wird. Es folgt dann eine vier- bis fünfstündige Extraktion mit absolutem Alkohol, der sich tief orange färbt und einen geringen Teil der Leukoverbindung des Porphyrins, vom Farbstoff nur wenig fortnimmt. Nun wird der Rückstand auf ein feinmaschiges Drahtnetz von 40 *cm* Durchmesser gebracht und mit 2 *l* 1%iger Natriumbikarbonatlösung übergossen. Das Abfiltrierende läuft hellgelb ab und dunkelt dann schnell nach. Diese Filtration dauert eine Nacht. Am nächsten Morgen gibt man wieder 2 *l* Natriumbikarbonatlösung hinzu und dekantiert, wenn nach drei bis vier Stunden die Filtration nahezu vollkommen aufhört, die klare Flüssigkeit vorsichtig und filtriert sie für sich. Den Kotschlamm behandelt man noch einmal mit 2 *l* 1%iger Natriumbikarbonatlösung und filtriert wieder durch das Sieb unter Berücksichtigung der obigen Angaben. Nach zirka drei Tagen, oft dauert es auch noch länger, hat man ein vollkommen

klares Filtrat. Die Zeitdauer spielt keine Rolle, da man bei schnellerer Operation doch noch den als Leukoverbindung vorhandenen Farbstoff oxydieren müßte. Die klaren Filtrate werden nun mit Essigsäure gefällt und der voluminöse Niederschlag auf drei Faltenfiltern abfiltriert, ein Prozeß, der fünf Tage dauert. Sämtliche Filter samt Niederschlägen werden mit Methylalkoholsalzsäure versetzt und nach 24stündigem Stehen auf Methylester verarbeitet, in der Weise, daß man den Auszug in einer großen Flasche mit Chloroform versetzt und die vier- bis fünffache Wassermenge hinzugibt, worauf mit Natronlauge unter Zusatz von Eis alkalisch gemacht wird, um jede Erwärmung zu vermeiden. Dann wird stark geschüttelt, wobei sich scheinbar durch das ganze Gefäß eine Emulsion bildet. Sie sitzt indessen hauptsächlich an der Glaswand, so daß weitaus die Hauptmenge der wässerigen Flüssigkeit aus dem Innern der Glasflasche ohne Schwierigkeit klar abgehebert werden kann. Durch Absaugen läßt sich dann die Emulsion vollständig entfernen und ein vorhandener Niederschlag abfiltrieren. Er wird gründlich mit Chloroform ausgezogen und dieser Extrakt zusammen mit dem Filtrat verarbeitet, das die Chloroformlösung des Farbstoffes enthält. Der im Chloroform unlösliche Teil enthält nur noch geringe Mengen von Kotporphyrin. Die Chloroformlösung wird im Vakuum eingedampft und hinterläßt etwa 6·6 *g* Rückstand, der nun wie beim Urinporphyrin durch Umkristallisation aus Chloroform-Methylalkohol unter Verwerfen der sich amorph abscheidenden Mengen — es ist daher fortgesetzte mikroskopische Kontrolle unerläßlich — gereinigt wird. Man erhält 0·85 *g* reinen Methylester des Kotporphyrins in verfilzten, vielfach gebogenen Nädelchen vom Schmelzpunkt 249 bis 250°, die allerdings immer noch ein wenig aschehaltig sind.

Der auf analogem Wege gewinnbare Äthylester des Kotporphyrins schmilzt bei 217 bis 220° und kristallisiert in langen, schmiegsamen Nadeln. Die Analyse führte zu den Formeln $C_{39} H_{42} O_8 N_4$ bezw. $C_{42} H_{48} O_8 N_4$ für die beiden Ester, und die Alkylbestimmung nach *Zeisel* ergab das Vorliegen einer dreibasischen Säure, was dann auch durch die Analyse des Kotporphyrins selbst bestätigt wurde, das durch alkalische Verseifung erhalten wurde. Ihm kommt die Formel $C_{36} H_{36} O_8 N_4$ zu.

1 *g* Kotporphyrinmethylester wird mit 100 *cm*³ 10%iger Natronlauge gekocht, bis — nach einer viertel Stunde — Lösung eingetreten ist. (Die Verseifung tritt hier also viel schwieriger ein als beim Urinporphyrinester, der unter gleichen Bedingungen schon nach einer Minute gelöst wird.) Zur Sicherheit wird noch eine Stunde gekocht, dann mit Wasser verdünnt, filtriert, das Filtrat mit Essigsäure unter Vermeidung eines größeren Überschusses angesäuert und der entstandene Niederschlag abgesaugt. Die Reinigung ist schwierig, weil das Kotporphyrin in destilliertem

Wasser kolloid löslich ist; man darf also nur mit wenig Wasser nachwaschen, und so wurde das Kotporphyrin nicht aschefrei erhalten. Sehr charakteristische Verbindungen sind das komplexe Kupfer- und das Chlorferrisalz des Kotporphyrinmethylesters, beide sind wie die entsprechenden Verbindungen des Urinporphyrinmethylesters zu erhalten. Das erstere kristallisiert in mikroskopischen Prismen und schmilzt scharf bei 285·5°, das letztere kommt aus der Chloroformätherlösung in derben Prismen heraus und zeigt in Pyridinlösung spektroskopisch drei Streifen, einen im Rot, zwei im Grün. Die Zusammensetzung der beiden Salze läßt sich durch die Formeln $C_{39} H_{40} O_8 N_4 Cu$ und $C_{39} H_{40} O_8 N_4 Fe Cl$ wiedergeben.

Vom Kotporphyrinmethylester ausgehend, konnte endlich ein

Tetrachlorkotporphyrindihydrochlorid

durch Behandlung mit Eisessigsalzsäure und Wasserstoffsuperoxyd erhalten werden, also auf demselben Wege, der vom Mesoporphyrin zum Tetrachlormesoporphyrin führte (vgl. S. 238). Nach zirka zehn Minuten trat hier Farbenumschlag in ein reines Grün ein und nach Stehen über Nacht erfolgte reichliche Kristallisation in derben, nadelförmigen Prismen mit starkem Oberflächenglanz. Die Analyse der abgesaugten und mit Eisessig und viel Äther ausgewaschenen Kristalle zeigte, daß Verseifung eingetreten war; entsprechend wurde eine der Formel $C_{36} H_{34} O_8 N_4 Cl_6$ entsprechende Zusammensetzung gefunden. Bei Verwendung von Bromwasserstoff statt Salzsäure trat keine Verseifung ein und das Produkt ergab bei der Analyse Werte, welche durch die Formulierung $C_{39} H_{40} O_8 N_4 Br_6$ zum Ausdruck kommen.

Bemerkenswert ist das völlig gleiche Verhalten der beiden Porphyrine und dies läßt mit Einbeziehung des Mehrgehaltes eines Karboxyls beim Kotporphyrin bereits den Schluß zu, daß dieses Karboxyl nicht für eines der Wasserstoffatome eingetreten sein kann, welche der Substitution durch Halogene zugänglich sind[1]).

Auf die chemischen Beweise für die Zusammengehörigkeit des Kot- und des Urinporphyrins mit dem Mesoporphyrin kann erst nach Besprechung der Methoden zum Abbau dieser Moleküle eingegangen werden.

Hier sei noch erwähnt, daß nach einem an sich selbst ausgeführten Versuch von *H. Fischer* Urinporphyrin, per os eingenommen, nicht in Kotporphyrin übergeführt wird, wenigstens

---

[1]) Das gleiche gilt auch für das Urinporphyrin, welches ebenfalls in ein Tetrachlorderivat überführt werden konnte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **98**. 80 (1916).



nicht vom normalen Menschen[1]). Es ist auch kaum zu bezweifeln, daß Urinporphyrin nicht das primäre Produkt ist, denn wenn es auch im Tierexperiment noch nicht geglückt ist, bei subkutaner Injektion Kotporphyrin in Urinporphyrin zu verwandeln, so findet sich doch Urinporphyrin nach subkutaner Einverleibung an ein Kaninchen nur im Harn wieder, keine Spur im Kot, es ist also ein ideal harnfähiger Stoff. Auf chemischem Wege ist es aber geglückt, Urinporphyrin in Kotporphyrin überzuführen[2]). 2 *g* Urinporphyrinmethylester werden in 90 *cm*³ heißem Eisessig gelöst, 12 *cm*³ konzentrierte Jodwasserstoffsäure und 3 *g* roter Phosphor zugegeben und zum Kochen erhitzt, wonach zunächst 18 *cm*³ Wasser zugefügt werden. Nach einstündigem Kochen am Rückflußkühler werden abermals 18 *cm*³ Wasser zugegeben, dann wird abgekühlt und vom Phosphor abgesaugt. Durch Zusatz von Wasser und 30 *cm*³ 33%iger Natronlauge fällt aus der tiefroten Lösung ein violetter, voluminöser Niederschlag aus, der abgesaugt und ausgewaschen wird. Er besteht im wesentlichen aus unverändertem Urinporphyrin. Das Filtrat des Niederschlages wird fünfmal ausgeäthert, der Rückstand des Äthers dann in der schon geschilderten Art in den Methylester verwandelt, der sich nun durch den Schmelzpunkt (250 bis 252°) und durch die Analyse als der Ester des Kotporphyrins erweist, was noch durch Überführung in das bei 283° schmelzende Kupfersalz erhärtet werden kann.

---

[1]) Dagegen wird es im Darm zur Leukoverbindung reduziert und auch Fäulnisbakterien bewirken nur diese Reduktion, keine Abspaltung von Kohlendioxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**. 172 (1915).

[2]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 116 (1916).

Der Abbau des Hämatins und der Porphyrine und die Synthese der Spaltungsprodukte.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Der Abbau des Hämatins und der Porphyrine zu wohl definierten Stoffen mit niederem Molekulargewicht ist zuerst durch Oxydation, dann durch Reduktion und schließlich durch Einwirkung von Alkylaten bei hoher Temperatur gelungen. Dabei hat sich in qualitativer Hinsicht ein vollständiges Übereinstimmen der Resultate insofern ergeben, als die auf verschiedenem Wege erhaltenen Spaltstücke miteinander in leicht zu übersehende chemische Beziehung gebracht werden konnten, und beim quantitativen Herausarbeiten der Bausteine des großen Moleküls wurden Mengen derselben erhalten, die keinen Zweifel darüber lassen, daß die möglichen Bruchstücke in Vollzähligkeit vorliegen.

Einen Einblick in die Konstitution der einen Hälfte des Hämatinmoleküls ergab zunächst die Aufklärung der Konstitution der bei der Oxydation erhaltenen Hämatinsäuren, die sich als Abkömmlinge der Maleinsäure erwiesen und demnach aus Pyrrolkernen des Hämatins hervorgegangen sein mußten, und zwar aus zwei Kernen, wofür einerseits ihre Menge und dann ihr Molekulargewicht ein Beleg war. Diese beiden Kerne mußten endlich innerhalb des Gesamtmoleküls insofern selbständig sein, als ihre beiden β-Stellungen durch Substituenten besetzt waren, die Verknüpfung zum ganzen Molekül also nur an den α-Stellungen erfolgt sein konnte.

Die Reduktion lieferte dann die Mutterstoffe der Hämatinsäuren, zwei isomere Säuren, die als Phono- und Isophonopyrrolkarbonsäure[1]) bezeichnet worden sind. Daneben entstanden nicht weniger wie vier substituierte Pyrrole, die der zweiten Hälfte des Häminmoleküls entstammen und dieser auch ihrer Gesamtmenge nach entsprechen. Und so wird denn auch häufig ein basischer Teil des Hämatins von einem sauren unterschieden.

[1]) Die letztere wurde zuerst als Spaltungsstück des Bilirubins aufgefunden.

Diese vier Pyrrole sind in ihrer Konstitution völlig aufgeklärt und ebenso wie die Hämatinsäure der Synthese zugänglich gemacht worden. Bei der Oxydation liefern alle vier Pyrrole denselben Stoff: das Imid der Methyläthylmaleinsäure; daher liefert dann auch die Oxydation des Hämins nach erfolgter Reduktion, z. B. zum Mesoporphyrin, sowohl Hämatinsäure wie das Imid. Dasselbe Produkt bildet sich aus der Hämatinsäure durch Abspaltung von Kohlendioxyd.

So baut sich also das Molekül des Hämins aus vier in β-β′-Stellung substituierten Pyrrolkernen auf und nur die Verkettung derselben ist noch nicht sicher bewiesen, da die Abbaumethoden nur Anhaltspunkte ergeben, die zwar recht wahrscheinliche und befriedigende, aber doch nicht bindende Schlüsse gestatten. Die Aufspaltung unter der Einwirkung von Oxydationsmitteln führt beim Hämin, Hämato- und Kotporphyrin nur zu den Hämatinsäuren, abgesehen von Stoffen mit niederem Molekulargewicht, wie Bernstein-, Essig-, Oxal-, Ameisen- und Kohlensäure, beim Dimethylhämin zum Methylester der Hämatinsäure, woraus mit höchster Wahrscheinlichkeit gefolgert wurde, daß im Hämin bereits Karboxyle enthalten sind, beim Meso- und Hämoporphyrin zur Hämatinsäure und zum Imid der Methyläthylmaleinsäure, beim Dimethyläther des Hämatoporphyrins zur Hämatinsäure und zu einem methoxylierten Imid[1]), beim Urinporphyrin zu einer karboxylierten Hämatinsäure. Während nun die Menge der Hämatinsäuren beim Hämin und Hämatoporphyrin zwei Molekülen auf ein Molekül des Farbstoffes nahekommt, entspricht sie beim Mesoporphyrin nur einem Molekül, wofür eine Begründung noch aussteht.

Das primäre Oxydationsprodukt ist die Hämatinsäure $C_8 H_9 O_4 N$, welche als das Imid einer 1-Methyl-2-karboxyäthylmaleinsäure erkannt worden ist; durch Verseifung entsteht daraus leicht die Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$, das Anhydrid jener dreibasischen Säure, so daß bei der Oxydation der Hämine bezw. der Porphyrine oft ein Gemisch beider Säuren erhalten wird. Am reinsten und in sehr guter Ausbeute läßt sich das Imid durch Oxydation des Hämatoporphyrins in schwefelsaurer Lösung mittels Chromsäure erhalten. Überhaupt erweist sich die Chromsäure als das geeignetste Oxydationsmittel, andere, wie Bleidioxyd oder Wasserstoffsuperoxyd in saurer Lösung, Salpetersäure, Permanganate, Hypochloride oder Ferrizyankalium, geben zwar auch Hämatinsäure, aber in weniger befriedigenden Ausbeuten. Neben der Hämatinsäure bildet sich, besonders bei Verwendung alter Hämatinpräparate, eine Säure, die im Gegensatz zur Hämatinsäure ein wasserlösliches Bariumsalz bildet. Wahrscheinlich handelt es sich um eine aus der

[1]) *W. Küster* und *H. Bauer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94.** 186 (1915).

Hämatinsäure durch Wassereinlagerung entstandene Oxysäure bezw. um deren Lakton[1]).

Der Chemismus der Oxydation des Hämins wurde von *W. Küster*[2]), nachdem die Zugehörigkeit der Hämatinsäuren zu den bisubstituierten Maleinsäuren erkannt worden war, darauf zurückgeführt, daß im Hämin und in den Porphyrinen Pyrrolringe vorhanden sein müssen, deren α-Methine durch Zufuhr von Sauerstoff in die Karbonyle eines Säureimids übergehen, indem auf das Entstehen von Dibrommaleinimid aus Pyrrol bei der Einwirkung von Natriumhypobromit[3]), auf das Entstehen von Glutarimid aus Piperidin durch Wasserstoffsuperoxyd[4]), von 4-Nitrophthalsäureimid aus 4-Nitrodihydroisoindol durch Chromsäure[5]) hingewiesen wurde.

Ciamician[6]) machte dann darauf aufmerksam, daß diese Oxydation ganz im Sinne der *Thiele*schen Regel bei konjugierten Doppelbindungen verlaufe, und *Plancher*) und *Cattadori*[7]) zeigten, daß aus Pyrrol selbst bei der Oxydation Maleinimid entstehen kann, und ferner, daß Substituenten in α-Stellung bei dieser Oxydation abgesprengt werden, indem z. B. α-β'-Dimethylpyrrol in Zitrakonimid überging, welcher Vorgang, auf das Hämatin übertragen, die Annahme rechtfertigt, daß beide Pyrrolkerne in ihm, welche bei der Oxydation Hämatinsäuren liefern, in α-α'-Stellung substituiert, d. h. mit den anderen Pyrrolkernen durch ein Bindeglied verknüpft sein können. Aus der empirischen Zusammensetzung folgt dann weiter, daß es sich hiebei nur um Methine handeln kann.

Bemerkenswert ist endlich, daß schon sehr geringe Mengen von Sauerstoff hinreichen, um in saurer Lösung Hämatinsäure zu bilden, allerdings in geringer Menge, während in alkalischer Lösung wenige Atome Sauerstoff von dem Hämatinmolekül zunächst einmal aufgenommen werden, ohne daß es zu einem Zerfall und zur Bildung von Hämatinsäure kommt.

Zur Herstellung der Hämatinsäuren kann man vom Hämin, Hämatin oder auch vom Hämatoporphyrin ausgehen.

a) 5 *g* Hämin werden mit 25 *g* konzentrierter Schwefelsäure verrührt und 50 *cm*³ 50%ige Schwefelsäure zugefügt[8]). Die trübe, dunkelbraune Flüssigkeit wird durch Eis gekühlt und unter Rühren

---

[1]) *W. Küster* und *J. Weller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 229 (1917).

[2]) *Liebig*s Ann. d. Chem. **315**. 182 (1900).

[3]) *Ciamicien* und *Silber*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **17**. 1745 (1884); **20**. 2595 (1887).

[4]) *Wolffenstein*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **25**. 2777 (1892).

[5]) *K. Fränkel*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 2811 (1900).

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 4213 (1901).

[7]) Gazz. chim. **31**. I. 402 (1903); R. Acc. Lincei. **12**. I. 10 (1903); **13**. I. 489 (1904).

[8]) *R. Willstätter*: *Liebig*s Ann. **373**. 237 (1910).

50 cm^3 wässeriger 30%iger Chromsäurelösung tropfenweise innerhalb einer Stunde eingetragen, während welcher Zeit die Temperatur auf 5 bis 7° gehalten wird. Die Farbe schlägt in Olivgrün um und wird beim Stehen in einigen Stunden rein grün, die abzufiltrierende Ausscheidung beträgt nur etwa 0·25 *g*. Das Filtrat wird erschöpfend ausgeäthert; nach dem Verjagen des Äthers hinterbleiben dann 2·34 *g* an rohem Imid der dreibasischen Hämatinsäure. Die Reinigung der rohen Säure erfolgt wie bei *b*).

b) 25 *g* Rohhämin oder Hämatinrückstände werden in einer Reibschale mit Alkohol angerieben und mit zirka 2·5 *l* 0·2%iger Natronlauge in eine Flasche übergeführt, die alsdann geschüttelt wird, bis vollständige Lösung erfolgt zu sein scheint. Man filtriert durch ein Kreppfilter (*Dreverhoff*), bringt noch nicht gelöstes Hämin durch Natronlauge völlig in Lösung, fällt das Filtrat durch Essigsäure im Überschuß und bringt den sehr voluminösen Hämatinschlamm auf große gehärtete Filter (*Dreverhoff* Nr. 495), wonach er mit lauem Wasser ausgewaschen wird. Man saugt nun noch ab und breitet auf Fließpapier aus, um die Hauptmenge des anhängenden Wassers zu entfernen. Nach einigen Stunden ist dann der Kuchen — er mag noch zirka 80% Feuchtigkeit enthalten — bröcklig geworden und läßt sich mit einem Spatel gut abheben. Das aus der angegebenen Menge Hämin erhaltene, fein verteilte Hämatin wird nun in 1·5 *l* Eisessig von 100% eingetragen, die sich in einem Becherglase von zirka 3 bis 4 *l* befinden; beim vorsichtigen Umrühren und Umschwenken löst sich das Hämatin rasch auf oder verteilt sich wenigstens so fein, daß beim Filtrieren meist nur ein geringer Rückstand bleibt, der bei weiterer Behandlung mit Eisessig ebenfalls in Lösung geht. Man kann also die Filtration unterlassen, die Lösung aber durch mäßiges Erwärmen auf dem Wasserbade beschleunigen, muß aber dann vor dem Eintragen der Chromsäure wieder auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Zur Oxydation verwendet man am besten die 21 Atome Sauerstoff auf das Hämatinmolekül entsprechende Menge Chromtrioxyd, das sind 55 *g* bei 25 *g* Hämin, die, in Eisessig gelöst, auf einmal in die Hämatinlösung eingetragen werden. Man sorgt bei Zimmertemperatur für gehörige Mischung und beginnt sogleich mit dem Abdestillieren der Essigsäure unter vermindertem Druck, wobei zweckmäßig zwei Fraktionskolben von je 1·5 *l* Inhalt gleichzeitig in bekannter Weise benützt werden; das Erhitzen geschieht im Wasserbade. Während die Essigsäure abdestilliert, was etwa eine Stunde in Anspruch nimmt, vollzieht sich die Aufnahme des Sauerstoffes, so daß der Rückstand an heißes Wasser, in welchem er bis auf geringe Reste löslich ist, sobald 21 Atome Sauerstoff pro Hämatinmolekül verwendet worden sind, meist keine freie Chromsäure mehr abgibt. Ist dies doch der Fall, so kann sie durch eine zweite

Destillation der wässerigen Lösung unter vermindertem Druck sicher beseitigt werden. Nachdem dann der Rückstand von neuem mit heißem Wasser aus dem Fraktionskolben herausgespült worden ist, filtriert man von den ungelösten Anteilen ab, die, wie erwähnt, im gegebenen Fall nur gering sind, d. h. etwa 5% vom verwendeten Hämin betragen und eisenhaltig sind, und erhitzt das Filtrat so lange unter Erneuerung des verdampfenden Wassers auf dem Wasserbade, bis der Geruch nach Essigsäure auch aus der schließlich konzentrierten Lösung verschwunden ist, wonach von unlöslich gewordenen Partikeln abfiltriert wird. Das Vertreiben der Essigsäure kann durch Rühren beschleunigt werden, immerhin nimmt es einige Tage in Anspruch. Zum Filtrat wird zunächst die Menge Schwefelsäure hinzugefügt, welche nötig ist, um alles Chrom in Chromisulfat überzuführen, in unserem Fall also 410 *g* 20%iger Säure, und das Verdampfen fortgesetzt, bis die in Freiheit gesetzte Essigsäure ebenfalls vollkommen entwichen ist, wobei es zu einer geringen Abscheidung harziger Natur kommen kann, von der wiederum filtriert wird, worauf das Filtrat noch mit einem Überschuß von Schwefelsäure — etwa 200 *g* 20%iger Säure — versetzt und nochmals längere Zeit auf dem Wasserbade digeriert wird, wobei man auf ein kleines Volumen, etwa 1 *l*, eindampft. Die erkaltete Lösung wird mit etwa dem gleichen Volumen Äther mehrere Male ausgeschüttelt, bis sich der Äther nicht mehr färbt. Oft gibt eine bereits erschöpfend mit Äther extrahierte Lösung von neuem Substanz an Äther ab, nachdem sie nach Zusatz von etwas Schwefelsäure auf dem Wasserbade erwärmt worden ist. Nach Abdestillation des Äthers erhält man dann die rohe Hämatinsäure in einer Ausbeute von zirka 15 *g*. Um schwerer in Äther lösliche Säuren zu gewinnen, aus denen noch Hämatinsäure in geringer Menge dargestellt werden kann, empfiehlt es sich, die Extraktion durch Äther in einem der zu diesem Zwecke konstruierten Apparate zu vervollständigen[1]).

[1]) Der nach Abdestillation des Äthers aus diesen Apparatauszügen verbleibende Rückstand, der viel Bernsteinsäure enthält, wird am besten durch Kochen mit Barytwasser bis zum Verschwinden der Ammoniakentwicklung verseift, die Lösung der Bariumsalze zur Trockne gebracht und letzteres Verfahren nach der Aufnahme des Rückstandes durch Wasser wiederholt, worauf man die noch löslichen Bariumsalze von den unlöslich gewordenen trennt. Die letzteren werden durch Salzsäure zerlegt und dieser Lösung durch Chloroform die Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$ entzogen. Die löslichen Bariumsalze werden ebenfalls durch Salzsäure zersetzt und so viel konzentrierte Säure zugefügt, daß eine Konzentration von etwa 20% Chlorwasserstoff erreicht wird, wonach ein Säuregemisch ausgeäthert werden kann, das danh langsam bis auf 180° erhitzt wird. Nach dem Erkalten löst man in Wasser und extrahiert mit Chloroform die gebildete Hämatinsäure. Wahrscheinlich liegen in Äther schwer lösliche Oxysäuren vor, die sich aus primär entstandener Hämatinsäure unter dem Einfluß von Schwefelsäure durch Einlagerung von Wasser gebildet haben und die beim Erhitzen wieder Wasser abspalten. *W. Küster* und *J. Weller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 253 (1917).

Die Reinigung beginnt damit, daß man die rohe Säure in kalter Sodalösung aufnimmt und diese alkalische Lösung mehrere Male mit Äther extrahiert, wodurch sehr geringe Mengen einer Substanz von noch nicht aufgeklärter Zusammensetzung entfernt werden. Die durch schwaches Erwärmen vom gelösten Äther befreite Flüssigkeit wird nun mit verdünnter Schwefelsäure stark sauer gemacht und einen Tag sich selbst überlassen, wonach eine klare Lösung resultiert, die von einem abgesetzten, harzigen Produkt abgegossen werden kann, worauf sie von neuem mit Äther extrahiert wird, nach dessen Abdunsten eine gereinigte Rohsäure erhalten wird (etwa 13·5 *g*). Diese besteht neben etwas Bernsteinsäure gewöhnlich aus den beiden Hämatinsäuren. Zur Abtrennung des Anhydrids trägt man in die wässerige Lösung der gereinigten Rohsäure 0·3 *g* frisch gefälltes Kalziumkarbonat ein, die etwa dem zwölften Teil der zur völligen Neutralisation nötigen Menge entsprechen, falls die gesamte gereinigte Rohsäure aus der einbasischen Substanz $C_8 H_9 O_4 N$ bestehen würde. Meist genügt die angegebene Menge des Kalziumkarbonats, um das in der Rohsäure enthaltene Anhydrid, das stärker sauer ist als das Imid, in zunächst löslich bleibendes Kalksalz überzuführen, so daß nunmehr Äther die stickstoffhaltige Hämatinsäure in fast reinem Zustande wegnimmt. Die ausgeätherte Kalksalzlösung gibt beim Erhitzen auf dem Wasserbade dann einen Ausfall, wenn größere Mengen der stickstofffreien Hämatinsäure vorhanden sind, was eintreten kann, wenn bei der Oxydation die Temperatur zu hoch war. In diesem Falle kann der ätherische Extrakt auch nach der ersten Behandlung mit Kalziumkarbonat noch beide Hämatinsäuren enthalten, so daß es sich empfiehlt, die Behandlung zu wiederholen. Man kann aber auch die ganze gereinigte Rohsäure zunächst vollständig in das Anhydrid der Hämatinsäure überführen und aus letzterem das Imid darstellen.

Zur Verseifung des in der Rohsäure enthaltenen Imids bedient man sich am besten des Barytwassers. Die wässerige Lösung derselben wird damit stark alkalisch gemacht und dann auf dem Wasserbade erhitzt; unter Entwicklung von Ammoniak fällt allmählich das in der Hitze unlöslich werdende Bariumsalz der stickstofffreien Säure aus. Da die letztere dreibasisch ist, das Imid nur einbasisch, so wird, falls nicht von vornherein ein großer Überschuß von Baryt verwendet worden ist, im Laufe der Umsetzung, die schon bei Verwendung von 2 *g* des Imids vier bis fünf Stunden dauert, vielleicht die alkalische Reaktion verschwinden, die alsdann durch Zusatz von Barytwasser wieder herzustellen ist. Sobald sich kein Ammoniak mehr entwickelt, dampft man zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit verdünnter Salzsäure auf und extrahiert die Lösung erschöpfend mit Äther. Der Rückstand der ätherischen

Auszüge besteht zum größten Teil aus dem Anhydrid $C_8 H_8 O_5$; zur Reinigung löst man ihn in der dreifachen Menge heißen Wassers und läßt unter stetem Umrühren erkalten, wobei sich das Anhydrid in feinen Kristallen abscheidet, die durch Absaugen von der Mutterlauge getrennt und durch Nachwaschen mit eiskaltem Wasser vollends von ihr befreit werden können. Die Mutterlauge sättigt man dann mit Barytwasser und erhitzt die Salzlösung auf dem Wasserbade, worauf sich der Rest der Säure $C_8 H_8 O_5$ als unlösliches Bariumsalz abscheidet, aus dem dann die Säure regeneriert werden kann.

Sehr leicht erhält man das Imid der Hämatinsäure im reinen Zustande bei der Oxydation von Hämatoporphyrin. Man löst 5 *g* des amorphen Stoffes in einem Gemisch von 500 cm^3 Wasser und 20 *g* Schwefelsäure und trägt in die 55° warme Lösung 11·7 *g* Chromtrioxyd, gelöst in 100 cm^3 Wasser von 55°, ein, wobei nur geringe Temperatursteigerung zu beobachten ist (auf etwa 60°). Zur Vollendung der Oxydation wird dann eine Stunde im Wasserbade erhitzt und die gebildeten flüchtigen Säuren (Ameisen- und Essigsäure) durch Destillation entfernt. Man filtriert von unlöslich gewordenen Teilen ab und äthert die erkaltete Lösung erschöpfend aus, setzt noch etwas Schwefelsäure (2 *g*) hinzu, erwärmt noch einmal auf dem Wasserbade, wobei sich noch etwas Harz abscheidet, und äthert abermals aus. Die ätherischen Auszüge hinterlassen nach dem Abdampfen des Lösungsmittels etwa 3 *g* Rohsäure, aus welcher 2·9 *g* gereinigte Rohsäure (vgl. S. 256) erhalten werden, die fast reines Imid $C_8 H_9 O_4 N$ vorstellen (*W. Küster*[1]).

Nach der O x y d a t i o n v o n M e s o p o r p h y r i n, die nach dem soeben gegebenen Beispiel ausgeführt wird, geht bei der Reinigung der Rohsäure aus alkalischer Lösung das Imid der Methyläthylmaleinsäure in Äther über, nach dem Ansäuern nimmt dann der Äther das Imid der Hämatinsäure auf. Durch die Reduktion der Seitenketten sind also Äthylgruppen entstanden und diese machen die Pyrrolringe, an welchen sie haften, so beständig, daß sie bei der Oxydation als Methyläthylmaleinimid erhalten bleiben. Die Ausbeuten betrugen bisher allerdings nur etwa ein Molekül von jedem dieser Stoffe auf das Molekül des Porphyrins berechnet (*W. Küster*[2]).

Die O x y d a t i o n d e s K o t p o r p h y r i n m e t h y l e s t e r s (1 *g* gelöst in 25 cm^3 50%iger Schwefelsäure und 25 cm^3 Wasser, hiezu 1·8 *g* Chromsäure in Wasser gelöst, ohne Kühlung in mäßigem Tempo) führte unter starker Erwärmung, wodurch vollständige Verseifung eintrat, zum Entstehen der stickstoff-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**. 174 (1909).
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1945 (1912).

haltigen Hämatinsäure (Ausbeute 0·25 *g*). Die Menge von neutraler Substanz war minimal, Methyläthylmaleinimid konnte nicht nachgewiesen werden (*H. Fischer*[1]).

Das Imid der dreibasischen Hämatinsäure $C_8 H_9 O_4 N$[2])

kristallisiert in monoklinen Prismen, die zu Zwillingen derartig verwachsen sind, daß die Kristalle rhombischen Habitus erhalten. Die Substanz ist in Wasser, Alkohol, Äther, Essigester, namentlich in der Wärme leicht löslich, so daß sie sich auch durch Umkristallisieren aus etwa der gleichen Menge heißen Wassers, aus heißem Essigester oder aus Ätherpetroläther reinigen läßt. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 114°. Sie verhält sich wie eine einbasische Säure und gibt mit einer Anzahl zweiwertiger Metalle (Ba, Ca, Cd, Zn) gut kristallisierende Salze von der allgemeinen Formel $(C_8 H_8 O_4 N)_2 Me$. Silber kann nicht nur den Wasserstoff des Karboxyls, sondern auch den der Imidgruppe vertreten, doch entsteht beim Fällen einer mit Ammoniak neutralisierten Lösung der Säure in absolutem Alkohol mit einer weingeistigen Silbernitratlösung in der berechneten Menge neben dem Salz $C_8 H_7 Ag_2 O_4 N$ auch noch ein Salz $C_8 H_9 Ag_2 O_5 N$, was mit einer Aufspaltung der Imidgruppe zusammenhängen muß. Wie denn überhaupt die letztere leicht verseift wird und schon beim Eindampfen einer wässerigen Lösung des Kalksalzes immer ein kleiner Teil desselben in das unlösliche Kalksalz der Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$ übergeht. Nebenbei sei erwähnt, daß die Kalksalzlösung ein ganz vorzüglicher Nährboden für allerhand Pilze sein dürfte.

Das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$

kann in recht verschiedenen Kristallformen auftreten, je nach den Bedingungen, unter denen es sich abscheidet und je nach dem verwendeten Lösungsmittel. Beim langsamen Verdunsten einer ätherischen Lösung können bis 15 *mm* große, rhombische Kristalle von teils kurzprismatischem, teils dicktafelförmigem Habitus erhalten werden. Der Schmelzpunkt liegt bei 97 bis 98°. In den meisten organischen Solventien ist das Anhydrid namentlich in der Wärme leicht löslich; daß man es zweckmäßig aus der dreifachen Menge heißen Wassers umkristallisiert, wurde bereits angegeben. Hiebei scheidet sich oft zuerst ein Öl aus, das allmählich kristallisiert. In wässeriger Lösung verhält sich das Anhydrid $C_8 H_8 O_5$ wie eine dreibasische Säure $C_8 H_{10} O_6$, von der sich auch das beim Eingießen der berechneten Menge Silbernitratlösung in eine durch Ammoniak neutralisierte Lösung des Anhydrids entstehende Silbersalz ableitet,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98.** 21 (1916).

[2]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **315.** 186 (1900).



dem also die Zusammensetzung $C_8 H_7 Ag_3 O_6$ zukommt; auch ein Trimethylester[1]) (Sp. 10 *mm* 165 bis 167°) ist bekannt, während der Triäthylester sehr unbeständig ist. Die Säure $C_8 H_{10} O_6$ hat bisher nicht dargestellt werden können.

Sehr charakteristisch ist das Verhalten der Erdalkalisalze und das des Kupfersalzes; die wässerige Lösung des Anhydrids zersetzt die Karbonate der erwähnten Metalle unter lebhafter Kohlensäureentwicklung, man erhält bei Zimmertemperatur eine klare Lösung, die beim Erwärmen eine fast quantitative Ausscheidung der Salze gibt. Dieser Niederschlag ist, wenn er ein Erdalkalimetall enthält, kristallisiert und weist auf vier Moleküle $C_8 H_8 O_5$ fünf Atome Metall auf, so daß die Zusammensetzung z. B. durch die Formel $C_{32} H_{28} Ca_5 O_{23}$ oder $C_{32} H_{30} Ba_5 O_{24}$ wiedergegeben werden kann. Im Gegensatz zu den erwähnten Salzen fallen die des Magnesiums, Zinks und Kadmiums beim Erwärmen ihrer kalt bereiteten Lösungen nicht aus.

Die Umwandlung des Anhydrids in das Imid der dreibasischen Hämatinsäure kann entweder durch Erhitzen mit alkoholischem Ammoniak auf 110° erfolgen oder mit Benützung der Ester der Säuren auf folgendem Wege: 10 *g* $C_8 H_8 O_5$ werden in 40 *g* absoluten Alkohols gelöst und so viel möglichst konzentrierte Salzsäure hinzugegeben, daß die Lösung zirka 2% Chlorwasserstoff enthält, worauf fünf Stunden am Rückflußkühler erhitzt wird; nun wird der Alkohol vollständig abdestilliert und der Rückstand mit etwa 100 cm^3 Wasser versetzt. Das abgeschiedene Estergemisch wird im Scheidetrichter von der wässerigen Lösung, welche unveränderte Hämatinsäure in geringer Menge enthält, getrennt, darauf in Äther gelöst und diese Lösung mit Ammoniak ausgeschüttelt. Im Äther verbleibt hiebei der Diäthylester der Hämatinsäure, der durch Ammoniak nur langsam gelöst und dabei wieder zu Hämatinsäure verseift wird. Die abgetrennte wässerige Schicht wird zur Trockne verdampft, worauf der Rückstand, der nicht mehr in Wasser löslich ist, in Äther überführt wird. Nach dem Trocknen der ätherischen Lösung und Verdampfen des Lösungsmittels hinterbleibt ein dickflüssiges Öl, das unter 16 *mm* Druck bei 205° siedet. Es stellt den Äthylester des Imids der Hämatinsäure vor.

Durch die Veresterung haben sich vornehmlich zwei Derivate von $C_8 H_8 O_5$ gebildet, ein Monoäthylester $C_{10} H_{12} O_5$ und ein aus zwei solchen Molekülen unter Hinzutritt von Wasser gebildetes Produkt $C_{20} H_{26} O_{11}$. Beide Ester werden durch Ammoniak in das Diammoniumsalz des Monoäthylesters der Hämatinsäure überführt ($C_{10} H_{20} O_6 N_2$), das alsdann beim Eindampfen seiner Lösung unter

[1]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **345**. 204 (1900); Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**. 520 (1908).

Verlust von Wasser und Ammoniak den Äthylester des Imids ($C_{10}H_{13}O_4N$) liefert:

$$H_7C_5\begin{cases}CO \\ CO \\ COOC_2H_5\end{cases}\!\!\!\!>O + 2NH_3 + H_2O = H_7C_5\begin{cases}CO\,O\,NH_4 \\ CO\,O\,NH_4 \\ CO\,O\,C_2H_5\end{cases} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow H_7C_5\begin{cases}CO \\ CO \\ CO\,OC_2H_5\end{cases}\!\!\!\!>NH + NH_3 + 2H_2O.$$

Den gleichen Ester erhält man aus der alkoholischen Lösung des Imids der Hämatinsäure durch Kochen mit etwas Salzsäure (5 *g* $C_8H_9O_4N$, 25 *g* absoluten Alkohol, 1·3 *g* 33%ige Salzsäure, fünf Stunden am Rückflußkühler[1]).

Der Methylester kann auf analogem Wege hergestellt werden, er bildet nadelförmige Kristalle, die bei 64° schmelzen.

Denselben Ester erhält man bei der Oxydation von Dimethylhämin[2]): 5 *g* werden mit Essigsäure angerieben und die Anreibung in einen Fraktionskolben von 1 *l* Inhalt gespült, so daß die Menge der Säure 300 *g* beträgt, worauf die Auflösung von 10·5 *g* Chromtrioxyd in 100 *g* Essigsäure (= 21 Atome Sauerstoff pro Häminmolekül) hinzufügt und die Säure möglichst vollständig unter vermindertem Druck abdestilliert wird. Der Rückstand wird dann in Wasser aufgenommen, die Lösung durch Eintragen von Soda alkalisch gemacht und mit Äther vorsichtig ausgeschüttelt, da leicht sehr lästige Emulsionsbildung eintritt. Nach Abdestillation des Äthers hinterbleiben bis 2 *g* eines gelblich gefärbten Sirups, der sich bis auf Spuren in heißem Wasser löst, um sich beim Erkalten als Öl abzuscheiden. Bei der fraktionierten Destillation desselben geht die Hauptmenge unter einem Druck von 20 *mm* bei 165° über und erstarrt nach einigen Tagen kristallinisch, wonach die Kristalle durch Aufstreichen auf Ton von den sirupös gebliebenen Anteilen getrennt werden können.

Zur Verseifung der Ester wird ein Gewichtsteil derselben mit zehn Gewichtsteilen 10%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade eine halbe Stunde lang erwärmt, bis klare Lösung eingetreten ist, die nach dem Erkalten ausgeäthert wird, wobei reine Hämatinsäure $C_8H_9O_4N$ resultiert.

Wie schon erwähnt, ist diese Säure als Imid einer 1-Methyl-2-karboxyäthylmaleinsäure erkannt worden; bei der Destillation spaltet sie Kohlendioxyd ab und liefert Methyläthylmaleinimid, denselben Stoff also, der sich neben Hämatinsäure bei der Oxy-

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**. 527 bis 533 (1908).

[2]) *W. Küster* und *A. Greiner*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 2503 (1912).



dation von Meso- oder Hämoporphyrin und dann bei der Oxydation des Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrols bildet. Durch Verseifung entsteht dann das dem Imid entsprechende Anhydrid und daß dieses und nicht die zweibasische Säure selbst entsteht, beweist schon die Zugehörigkeit zur Klasse der bisubstituierten Maleinsäuren, die alle nur in der Form ihres Anhydrids erhalten werden können. Als weitere Belege für die angegebene Konstitution sei angeführt, daß die Oxydation zur Bernsteinsäure führt[1]) und daß bei der Reduktion zwei stereoisomere Säuren, denen die empirische Formel $C_8 H_{12} O_6$ zukommt und die zunächst als Hämotrikarbonsäuren bezeichnet wurden, erhalten werden. Daß die Reduktion nur in saurer und nicht in alkalischer Lösung gelang, zeigte wieder die Zugehörigkeit der Hämatinsäure zur Klasse der bisubstituierten Maleinsäuren, die sich ganz gleich verhalten. Die Eigenschaften der Hämotrikarbonsäuren, namentlich ihre Unfähigkeit, ein Anhydrid zu geben und ihre geringe Leitfähigkeit schlossen aus, daß es sich in ihnen um substituierte Trikarballylsäuren handelte; schließlich erwies sich die hoch schmelzende Hämotrikarbonsäure als identisch mit einer von *Perkin*[2]) synthetisch erhaltenen Säure, die eine α-γ-δ-Pentantrikarbonsäure vorstellen mußte. Alle Beobachtungen sprachen also dafür, daß die Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$ als das Anhydrid einer α-γ-δ-Pentantrikarbonsäure aufzufassen ist:

```
H3C — C = C — CH2 — CH2 — CO OH
      |   |
      OC  CO
       \ /
        O
```

und die nach diesem Bilde vollzogene Synthese hat die Auffassung bestätigt.

Zur Überführung des Imids der Hämatinsäure in das Imid der Methyläthylmaleinsäure[3]) werden 5 *g* des ersteren in einem kleinen Fraktionskolben auf dem Sandbade erhitzt, wobei unter Entwicklung von Kohlendioxyd die Hauptanteile bei zirka 190° übergehen. Das Destillat, 3 bis 3·5 *g*, ist dickflüssig und stark gefärbt, riecht brenzlich und zugleich an Jodoform erinnernd. Durch eine zweite Destillation bei 40 *mm* Druck wird eine gelbe, ölige Flüssigkeit erhalten, welche beim Erkalten in spitzen Nadeln kristallisiert. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser können sie farblos erhalten werden; der Schmelzpunkt liegt bei 67 bis 68°, beim stärkeren, vorsichtigen Erhitzen findet Sublimation statt. Die Kristalle lösen sich leicht in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol,

[1]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. **345**. 28 (1905).

[2]) Journ. Chem. Soc. London. **93**. 573; Chem. Zentralbl. **1908**. I. 1780.

[3]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **345**. 23 (1905).

Essigester, Petroläther und Schwefelkohlenstoff, sehr schwer in kaltem, leichter in heißem Wasser mit neutraler Reaktion.

Zur Synthese[1]) dieses Imids muß man zunächst das Anhydrid der Methyläthylmaleinsäure darstellen, was unter Anlehnung an eine von *Michael* und *Tissot*[2]) gegebenen Methode zur Herstellung des Dimethylmaleinanhydrids mit Hilfe von Äthylazetessigester ausgeführt wird. An diesen wird Blausäure angelagert und nach erfolgter Verseifung die entstandene substituierte Apfelsäure der Destillation unterworfen, wobei die gewünschte Abspaltung von Wasser erfolgt:

$$H_3C - CO - \underset{\displaystyle COOR}{\underset{|}{CH}} - C_2H_5 \longrightarrow H_3C - \underset{\displaystyle CN}{\underset{|}{\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{C}}}} - \underset{\displaystyle COOR}{\underset{|}{CH}} - C_2H_5 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow H_3C - \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{C}}}} - \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle H}{\overset{|}{C}}}} - C_2H_5 \longrightarrow H_3C - \underset{\displaystyle OC}{\underset{|}{C}} = \underset{\displaystyle CO}{\underset{|}{C}} - C_2H_5 \quad (OC-O-CO)$$

17·5 *g* Äthylazetessigester, 52·5 *g* absoluter Äther und 18·5 *g* feinst gepulvertes, reinstes Zyankalium werden in ein mit Korkstopfen verschließbares, dickwandiges Glas eingewogen und eine Stunde lang durch Einstellen in Eis abgekühlt. Das Eintragen der zur Zersetzung des Zyankaliums nötigen Menge 40%iger Salzsäure (= 22 cm^3 vom spezifischen Gewicht 1·21) erfolgt im Laufe von zehn Stunden in der Weise, daß zunächst je 3 cm^3 zugeträufelt, dann eine Stunde geschüttelt, dann eine Stunde gekühlt wird. Sind dann innerhalb sechs Stunden 9 cm^3 Salzsäure verbraucht worden, so können die restierenden 13 cm^3 in zwei Anteilen, natürlich unter Eiskühlung, hinzugegeben werden. Das Ganze wird dann über Nacht in Eis gebettet; an den beiden folgenden Tagen wird dann abwechslungsweise geschüttelt und durch Eis gekühlt, wonach die entwickelte Blausäure verbraucht erscheint. Eine Färbung zeigt immer eine Zersetzung an, mit der eine Verminderung der Ausbeute am gewünschten Produkt Hand in Hand geht; sie wird bei Einhaltung der gegebenen Vorschrift vermieden.

Es befinden sich nun in dem Glase zwei Flüssigkeitsschichten; die ätherische enthält das Reaktionsprodukt, das nach Ab-

[1]) *W. Küster* und *K. Haas*: Ann. d. Chemie. **345**. 10 (1905).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **24**. 2545 (1891); Journ. f. prakt. Chem. **46**. 287 bis 298 (1892).



destillation des Äthers als schwach gelb gefärbte, widerlich riechende Masse zurückbleibt. Nach Zusatz von 100 cm^3 konzentrierter Salzsäure erfolgt nun durch etwa zwölfstündiges Erhitzen auf dem Wasserbade die Verseifung. Die jetzt dunkelgelbe Flüssigkeit wird dann auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht und der stark hygroskopische Rückstand fünfmal mit je 50 cm^3 reinem, heißem Essigester extrahiert. Aus der vom Chlorammonium abfiltrierten braunen Lösung wird jetzt das Lösungsmittel abdestilliert und die im Fraktionskölbchen zurückbleibende Methyläthyläpfelsäure im Bleibade sehr langsam erhitzt. Dabei gehen zwischen 80 bis 130° gelbliche, nach Essigester und Essigsäure riechende Anteile über, bei 140° tritt Wasserabspaltung ein, und es erfolgt bei einer zwischen 140 und 230° schwankenden Temperatur die Destillation einer hell- bis dunkelgelb gefärbten Substanz. Durch viermalige fraktionierte Destillation können hieraus zwischen 220 bis 230° übergehende Anteile in einer durchschnittlichen Ausbeute von 40% abgeschieden werden, die das rohe Methyläthylmaleinanhydrid vorstellen. Die weitere Reinigung erfolgt durch Überführung in das Bariumsalz. Zu dessen Herstellung löst man das rohe Anhydrid in Ammoniak, filtriert die Lösung von harzigen Ausscheidungen, versetzt das möglichst neutrale, etwa 15% Anhydrid enthaltende Filtrat mit der berechneten Menge Bariumchloridlösung und erhitzt zum Sieden, wodurch sich perlmutterglänzende, weiße Blättchen abscheiden. Sie werden unter Benützung eines Heißwassertrichters abfiltriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Die Ausbeute beträgt 67% der theoretisch möglichen, d. h. wenn das Rohanhydrid rein gewesen wäre.

Zur Zurückgewinnung des Anhydrids wird das Bariumsalz durch Salzsäure gelöst, die Lösung ausgeäthert, der Äther abdestilliert, nachdem mit getrocknetem Natriumsulfat behandelt worden war, und der Rückstand der fraktionierten Destillation unterworfen. Jetzt geht das reine Anhydrid bei 223 bis 225° über in einer Menge, die 17·3% des verwendeten Äthylazetessigsäureesters entspricht. Es ist eine ölige, stark lichtbrechende Flüssigkeit, die einen ausgesprochenen, an Juchtenleder erinnernden Geruch besitzt; in organischen Solventien ist sie leicht, in kaltem Wasser kaum löslich.

Das Anhydrid kann auch durch trockene Destillation der Hämatinsäure $C_8 H_8 O_5$ erhalten werden.

Zur Überführung in das Imid wird je 1 *g* im Einschmelzrohr mit 10 cm^3 einer bei 0° gesättigten alkoholischen Ammoniaklösung übergossen, das Rohr unter Eiskühlung des Inhaltes zugeschmolzen und dann drei Stunden auf 130° erhitzt. Der Röhreninhalt wird dann im Vakuum vom Ammoniak und Alkohol befreit und der Rückstand der Destillation unterworfen. Das Imid geht bei 40 *mm*

Druck bei 180 bis 190° über und kristallisiert nach einiger Zeit; ist das nicht der Fall, so kann es durch Aufnahme in heißem Wasser oder in 0·2%igem Ammoniak, Entfärbung der Lösung durch Tierkohle, Filtration und Einstellen in Eis zur Kristallisation gebracht werden. Das synthetisch gewonnene Imid gleicht in allen Eigenschaften dem aus der Hämatinsäure erhaltenen Stoff[1]). Aus Meso- oder Hämoporphyrin sowie aus Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrol kann es durch Oxydation dieser Stoffe mit Chromsäure erhalten werden.

Bei der Verseifung des Imides durch Barytwasser[2]) entsteht neben dem Bariumsalz der Methyläthylmaleinsäure ein zweites Salz, und zwar das einer Dikarbonsäure $C_7 H_{10} O_4$, die als Itakonsäurederivat angesprochen werden kann und sich also durch Verschiebung der Doppelbindung gebildet hat.

Darstellung der Hämotrikarbonsäuren $C_8 H_{12} O_6$ [3]).

Zur Reduktion des Anhydrides der dreibasischen Hämatinsäure löst man einen Teil desselben in 15 Teilen warmen Wassers, setzt der Lösung vier Teile 80%ige Essigsäure zu und trägt unter Erwärmen auf dem Wasserbade innerhalb acht Stunden zwei Teile Zinkstaub in ganz kleinen Portionen ein. Dann filtriert man die Lösung vom unverbrauchten Zink und kocht letzteres mit heißem essigsäurehaltigen Wasser aus, worauf die vereinigten Filtrate mit Schwefelwasserstoff gesättigt werden. Vom Zinksulfid wird abfiltriert, der Niederschlag sorgfältig ausgewaschen und alle Filtrate auf ein kleines Volumen eingeengt. Nach dem Erkalten kristallisiert dann im Laufe einiger Tage ein Teil des Reduktionsproduktes heraus, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser den scharfen Schmelzpunkt 175 bis 176° zeigt. Die Mutterlaugen werden zur Trockne gebracht und der Rückstand im Schwefelsäurebade auf 180 bis 190° erhitzt. Die erkaltete Schmelze gibt an Äther fast reine, bei 140° schmelzende Säure ab, die durch Umkristallisation aus heißem Azeton gereinigt werden kann. Die Ausbeuten sind fast quantitativ, und zwar werden von der hoch schmelzenden Säure etwa 30% gewonnen (bei Verwendung von 10 *g* $C_8 H_8 O_5$ kristallisieren z. B. 2·9 *g* nach dem Eindampfen der Gesamtflüssigkeit bis auf 30 *cm*³ in zwei Fraktionen heraus). Beim Erhitzen über den Schmelzpunkt geht die bei 175° schmelzende Säure in die Säure vom Schmelzpunkt 140 bis 141° über. Aus diesem Verhalten und der großen Ähnlichkeit der Säuren — sie unterscheiden sich nur durch die Löslichkeitsverhältnisse — und ihrer Salze darf ge-

---

[1]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. **345**. 18 (1905).

[2]) *W. Küster*: *Liebigs* Ann. **315**. 216 (1900); Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 248 (1917).

[3]) *W. Küster* und *O. Mezger*: *Liebigs* Ann. **345**. 31 (1905).

schlossen werden, daß sie stereoisomer sind, was mit ihrer Konstitution übereinstimmt, da bei der Reduktion einer $\alpha-\gamma-\delta$-Pentantrikarbonsäure (Hämatinsäure) zwei Kohlenstoffatome asymmetrisch werden, wonach zwei inaktive Säuren entstehen müssen. Die bei 140° schmelzende Hämotrikarbonsäure ist als die maleinoide Form anzusprechen, einmal weil sie bei der Reduktion des Anhydrides der Hämatinsäure, das sicher dem maleinoiden Typus angehört, als Hauptprodukt entsteht, und dann auch, weil sie sich fast ausschließlich bei der vorsichtigen Verseifung des Imides bildet, das bei der Reduktion des Imides der Hämatinsäure durch Zinkstaub in essigsaurer Lösung gewonnen wird. Sie kristallisiert in zu Rosetten vereinigten spitzen Nadeln, löst sich in 7·3 Teilen Wasser, in 29·7 Teilen Essigester von je 10°. Mit Zinksulfat gibt eine wässerige, neutrale Lösung des Ammonsalzes keine Fällung bei Z. T., im Moment des beginnenden Kochens aber eine weiße, flockige Abscheidung, die beim Erkalten allmählich wieder verschwindet.

Die Hämotrikarbonsäure vom Schmelzpunkt 175 bis 176° kristallisiert in zu Büscheln vereinigten Nadeln; ein Teil der Säure erfordert bei 10° 74·6 Teile Wasser bezw. 148·75 Teile Essigester zur Lösung, sonst gleicht sie der maleinoiden Form durchaus, z. B. auch in bezug auf das Verhalten des Zinksalzes und auch darin, daß eine kleine Menge beim Erhitzen auf dem Platinblech sich ohne Abscheidung von Kohlenstoff verflüchtigt.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese der Hämatinsäure[1]) diente der Azetylglutarsäureester; durch Anlagerung von Blausäure und Verseifung der erhaltenen Verbindung wird ein zunächst amorpher Stoff erhalten, der ein Gemisch razemischer Oxysäuren mit ihren Laktonen vorstellt. Ein Bestandteil desselben kann kristallisiert erhalten werden und erweist sich als eine der gesuchten Oxysäuren $C_8H_{12}O_7$ (δ-Oxypentan-α-β-δ-trikarbonsäure). Das amorphe Gemenge liefert aber bereits durch Abspaltung von Wasser beim Erhitzen bis auf 180° Hämatinsäure, so daß sich folgender Verlauf der Reaktionen vollzieht:

$$\begin{array}{l} H_3C-CO-\underset{\displaystyle CH_2-CH_2-COOR}{\underset{|}{CH}}-COOR \end{array} + HCN =$$

$$= H_3C-\underset{\displaystyle CN}{\underset{|}{\overset{\overset{\displaystyle OH}{|}}{C}}}-\underset{\displaystyle CH_2-CH_2-COOR}{\underset{|}{CH}}-COOR \xrightarrow{\text{Verseifung}}$$

[1]) *W. Küster* und *Joh. Weller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 229 (1917).

$$H_3C\,\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle OH}{C}} - \underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle H}{C}} - CH_2 - CH_2 - COOH \xrightarrow{\text{Wasserabspaltung}}$$

$$\longrightarrow H_3C - C = C - CH_2 - CH_2 - COOH. \quad (\text{C}=\text{C bridged by } OC\!-\!O\!-\!CO)$$

Als Nebenprodukt tritt Azetylbuttersäure auf, welche aus den Teilen des Azetylglutarsäureesters entsteht, die sich der Kondensation mit Blausäure entzogen haben:

$$H_3C - CO - \underset{\displaystyle CH_2 - CH_2 - COOR}{CH} - COOR \longrightarrow$$

$$\longrightarrow H_3C - CO - \underset{\displaystyle CH_2 - CH_2 - COOH + CO_2.}{CH_2}$$

Ihre Menge ist oft recht bedeutend, und entsprechend verringern sich die Ausbeuten an den Oxysäuren, so daß auch die Ausbeute an Hämatinsäure recht gering werden kann, obgleich die Wasserabspaltung aus den Oxysäuren bei Einhaltung bestimmter Bedingungen fast quantitativ und ohne gleichzeitige Abspaltung von Kohlendioxyd erfolgt.

Die Darstellung des Azetylglutarsäureesters

erfolgt in Anlehnung an die von *Conrad* und *Limpach*[1]) gegebene Vorschrift für die Gewinnung von Azetylbernsteinsäureester.

2·3 *g* Natrium werden in 32 *g* absolutem Alkohol gelöst, nach dem Abkühlen erfolgt der Zusatz von 14 *g* Azetessigester und sofort darauf von 22·8 *g* reinem β-Jodpropionsäureester, wonach Erwärmung und Trübung erlolgt. Nach zweistündigem Erwärmen auf dem Wasserbade am Rückflußkühler wird der Alkohol abdestilliert, das abgeschiedene Jodnatrium in Wasser, die organischen Stoffe in Äther gelöst und die ätherische Lösung mit kleinen Mengen Wassers geschüttelt, bis die Reaktion auf Jodionen verschwunden ist. Aus der getrockneten ätherischen Lösung wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand unter vermindertem Druck fraktioniert. Die bei 22 bis 25 *mm* bei 169 bis 171° siedende Fraktion — ein farbloses, schwach riechendes Öl — stellt den Azetylglutarsäureester vor.

[1]) *Liebig*s Ann. d. Chemie. **192**. 157 (1878).



Die Anlagerung von Blausäure an den Azetylglutarsäureester geschieht in der Weise, wie sie für die Darstellung des Nitrils der Methyläthyläpfelsäure beschrieben wurde (vgl. S. 262). Es wird also die Lösung von 9 *g* des Esters in 27 *g* Äther mit 7·5 *g* feinst gepulvertem, reinem Zyankalium versetzt und in das gekühlte Gemisch die berechnete Menge Salzsäure (10·5 *g* vom spezifischen Gewicht 1·19) in kleinen Portionen eingetragen. Nach dreitägiger Einwirkung wird die ätherische Lösung durch Watte filtriert, das feuchte Salz wiederholt mit Äther nachgewaschen, der Äther abdestilliert und der Rückstand zur Vertreibung anhaftender Blausäure unter Durchleiten von Luft im Wasserbade erwärmt. Es hinterbleibt dann ein bräunlich gefärbtes Öl von eigenartigem Geruch.

Die Verseifung des Zyanwasserstoffanlagerungsproduktes wird durch 14stündiges Erhitzen mit 70 *g* 25%iger Salzsäure im Wasserbade am Rückflußkühler bewirkt, wonach die erkaltete, braungelbe Flüssigkeit in einem Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther ausgezogen wird. Zu beachten ist, daß die entstandene Oxysäure nur schwer in Äther übergeht; man dampft daher die salzsaure Lösung zur Trockne und extrahiert den Rückstand mit Essigester. Aus den Extrakten wird dann das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und diese Lösung mit Chloroform extrahiert, wodurch die Azetylbuttersäure beseitigt wird. Die wässerige Lösung, zur Trockne verdampft, hinterläßt dann einen Sirup, der das Gemisch der beiden razemischen δ-Oxypentan-α-γ-δ-trikarbonsäuren mit ihren Laktonen enthält. Erhitzt man kleine Mengen dieses Sirups in einem Paraffinbade, dessen Temperatur binnen 36 Minuten von 175 bis 181° steigt, so vollzieht sich die Wasserabspaltung und die Lösung des Rückstandes in wenig Wasser gibt beim Ausschütteln mit Chloroform an dieses Lösungsmittel Hämatinsäure ab, die nach Abdestillation des Chloroforms sofort auskristallisiert und durch Umkristallisation aus heißem Wasser gereinigt werden kann.

Läßt man den durch Verseifung des Zyanwasserstoffanlagerungsproduktes erhaltenen Sirup wochenlang stehen, so tritt eventuell Kristallisation ein. Die mechanisch zu entfernenden und durch Betupfen mit Äther von der anhängenden Mutterlauge zu befreienden Kristalle können dann aus heißem Wasser umkristallisiert werden. Sie schmelzen bei 108 bis 110° und erweisen sich durch die Analyse als das Hydrat einer der razemischen δ-Oxypentan-α-γ-δ-trikarbonsäuren $C_8 H_{12} O_7$. Bei längerem Erhitzen auf 90° verliert die Säure nicht nur das Kristallwasser, sondern außerdem noch fast zwei Moleküle Wasser, so daß es also zur Lakton- und zur Anhydridbildung kommt und die Bildung der Hämatin-

säure, die beim Erhitzen auf 180° entsteht, anscheinend auf einer Umlagerung im Sinne der folgenden Formelbilder beruht:

```
             H3C                                  CH3
              |                                    |
       HO  —  C  — CO OH                  O————C  -- CO
              |                    →      |        |       >O  →
             HC  — CO OH                 OC     HC — CO
              |                           |        |
CO OH — CH2 — CH2                        CH2 —— CH2

                          CH3
                           |
                           C — CO
                      →    ‖       >O
                           C — CO
                           |
                          CH2 — CH2 — CO OH.
```

Gewinnung einer karboxylierten Hämatinsäure aus Urinporphyrin.

Das Urinporphyrin hat sich, wie erwähnt, als eine siebenbasische Säure erwiesen; während nun das Kotporphyrin, das nur dreibasisch ist, bei der Oxydation Hämatinsäure gibt, erhielt *H. Fischer*[1]) bei der Oxydation des Urinporphyrins eine karboxylierte Hämatinsäure, und zwar in einer Ausbeute, die besagt, daß sie aus zwei Pyrrolkernen entstanden sein muß, womit also der Ort von $2 \times 2 = 4$ Karboxylen des Urinporphyrins ermittelt ist. Außerdem wurde bewiesen, daß das neue Karboxyl nicht etwa sekundären Ursprunges ist, d. h. nicht etwa erst bei der Oxydation entstanden ist, da der Ester des Urinporphyrins bei der Oxydation den Ester der neuen Säure bildet. An welcher Stelle die Hämatinsäure und damit das Urinporphyrin karboxyliert ist, konnte bisher nicht festgestellt werden, so daß für die neue Säure noch drei Formeln in Frage kommen.

```
                              I
CO OH — CH2 — C  =  C — CH2 — CH2
              |     |           |
             OC    CO         CO OH
               \  /
                N
                H
```

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 78 (1916).

$$\text{II}$$

$$\begin{array}{ccccccccccc} H_3C & - & C & = & C & - & CH_2 & - & CH & - & COOH \\ & & | & & | & & & & | & & \\ & & OC & & CO & & & & COOH & & \\ & & & \diagdown & \diagup & & & & & & \\ & & & & N & & & & & & \\ & & & & H & & & & & & \end{array}$$

$$\text{III}$$

$$\begin{array}{ccccccccccc} H_3C & - & C & = & C & - & CH & - & CH_2 & - & COOH \\ & & | & & | & & | & & & & \\ & & OC & & CO & & COOH & & & & \\ & & & \diagdown & \diagup & & & & & & \\ & & & & N & & & & & & \\ & & & & H & & & & & & \end{array}$$

Zur Ausführung der Oxydation wird 1 *g* Urinporphyrin in 25 cm^3 50%iger Schwefelsäure gelöst und 2 *g* Chromtrioxyd in Wasser gelöst, langsam unter heftigem Rühren hinzugegeben. Waren die Lösungen durch Eis abgekühlt, so scheidet sich zunächst ein schwer lösliches Chromat ab, wie es auch beim Hämato- und Mesoporphyrin beobachtet wird, bei ZT. vollzieht sich die Oxydation sofort. Nach vier- bis fünfstündigem Stehen wird die tiefgrün gefärbte Flüssigkeit erschöpfend ausgeäthert, dem Ätherauszug die sauren Teile durch Sodalösung entzogen (im Äther bleiben nur geringe Mengen nicht kristallisierender Substanz zurück) und nach dem Ansäuern wieder in Äther überführt. Nach dem Abdestillieren hinterbleiben dann 0·5 *g* zum größten Teil bereits kristallisierte Rohsäure, die durch Aufnahme in Azeton, Zusatz von Äther und Eindunsten in derben Prismen erhalten und durch Absaugen, Abpressen und Nachwaschen mit absolutem Äther vollends gereinigt werden kann. Der Schmelzpunkt dieser in einer Ausbeute von 0·25 *g* erhaltenen, zweibasischen Säure von der Zusammensetzung $C_9H_9O_6N$ liegt zunächst bei 180 bis 183°, erhöht sich aber nach dem Trocknen bei 100° im Vakuum über Phosphorpentoxyd, wobei eine 1% betragende Gewichtsabnahme erfolgt, auf 188° unter Aufschäumen; von 170° ab findet bereits ein geringes Sintern statt. In den üblichen Lösungsmitteln, außer Azeton, ist die karboxylierte Hämatinsäure recht schwer löslich. Beim Erhitzen im Vakuum im Ölbade spaltet sie bei 180° Kohlendioxyd ab und liefert ein in derben Prismen kristallisierendes Sublimat, das mit dem Imid der Hämatinsäure identisch ist. Beim Erhitzen unter gewöhnlichem Druck wird dagegen sogleich Methyläthylmaleinimid erhalten.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 78 (1916).

Die Aufspaltung des Hämins durch Reduktion

ist zuerst *Nencki* und *Zaleski*[1]) durch Jodwasserstoffeisessig gelungen, dann hat *Piloty*[2]) das Hämatoporphyrin durch Zinn und Salzsäure reduziert und gespalten; das Verfahren von *Nencki* hat sich aber als vorteilhafter erwiesen und so möge es hier in der Modifikation von *H. Fischer*[3]) wiedergegeben sein, welche gestattet, die basischen und die sauren Spaltstücke in e i n e r Operation zu gewinnen.

50 *g* Hämin werden in eine Mischung aus 830 *cm*³ Eisessig und 420 *cm*³ Jodwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·96) eingetragen, worauf eine Stunde im siedenden Wasserbade erwärmt wird; dann wird das ausgeschiedene Jod durch Zusatz von zirka 40 *g* Phosphoniumjodid reduziert, wobei die Lösung fast farblos wird. Das Säuregemisch wird nun unter vermindertem Druck bei zirka 80° abdestilliert, der grünbraune Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung durch wenig Soda unter starkem Schütteln schwach alkalisch gemacht, worauf das gebildete Pyrrolgemisch mit Wasserdampf im Kohlensäurestrom abdestilliert wird. Der Rückstand wird auf die Phonopyrrolkarbonsäuren verarbeitet (vgl. S. 276).

Das Destillat wird dreimal mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther im Vakuum bei ZT. abdestilliert. Da die Ausbeute an Pyrrolen bis 13 *g* beträgt, müssen für die Trennung des Pyrrolgemisches (siehe unten) mindestens 250 *g* Hämin auf vorstehende Art verarbeitet werden[4]).

Trennung von β-β′-Methyläthyl-, Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrol[5]).

64·5 *g* des Pyrrolgemisches werden mit 64 *cm*³ Äther gemischt und unter kräftigem Umschwenken 520 *cm*³ 10%iger ätherischer Pikrinsäurelösung eingetragen, wobei sich ein Kristallbrei bildet, der heftig durchgeschüttelt und dann eine Viertelstunde in Eis gestellt wird, wonach abgesaugt werden kann. Der Niederschlag wird nun mit 480 *cm*³ ätherischer Pikrinsäurelösung, die gleichzeitig als weiteres Fällungsmittel dient, ausgewaschen und so eine erste Fraktion *A* im Gewicht von 71·5 *g* erhalten. Die Mutterlauge scheidet durch das Hinzukommen der 480 *cm*³ Pikrinsäurelösung bei halbstündigem Stehen in Eis weitere 49·4 *g* Pikrate ab (Fraktion *B*). Die Mutterlauge dieser zweiten Fällung wird nun

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**. 997 (1901).

[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **377**. 328 (1910).

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 3313 (1911) mit *E. Bartholomäus.*

[4]) Die Trennung von Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrol gelingt schon mit 10 *g* Pyrrolöl.

[5]) Ebenda. **47**. 1820 (1914) mit *K. Eismayer.*



nochmals mit 520 cm^3 der Pikrinsäurelösung versetzt und ohne Rücksicht auf etwa sich abscheidende Kristalle in einer großen Schale schnell im Luftstrom bei ZT. abgedunstet, wobei man an den Wänden der Schale ein rotes Öl bemerkt. Nachdem der Äther völlig verjagt ist, wird der Rückstand mit viel Petroläther durchgearbeitet und dann abgenutscht (Fraktion *C*, etwa 76 *g*). Die petrolätherische Lösung wird in einem entsprechend großen Scheidetrichter mit viel Wasser unterschichtet und durch allmähliche Zugabe von Natronlauge und kräftiges Durchschütteln von der Pikrinsäure befreit[1]). Die abgehobene petrolätherische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Verjagen des Lösungsmittels der Rückstand im Vakuum destilliert, wobei zu beachten ist, daß das Gewicht desselben wenig mehr als 2 *g* betragen wird. Unter 15 *mm* Druck siedet er bei 75 bis 80° ziemlich gleichmäßig, so daß man etwa 1·7 *g* Destillat erhält. In diesem Öl, das sich also mit Pikrinsäure nicht zu einem kristallisierten Salz verbindet, liegt

das β-β'- oder 3.4-Methyläthylpyrrol $C_7H_{11}N$

vor. Es ist von *Piloty* und *Stock* als Spaltstück des Hämins zuerst aufgefunden worden, welcher Befund dann von *H. Fischer* und *Eismayer*[2]) bestätigt werden konnte, die auch die Konstitution durch Überführung in das 2.4.5-Triäthyl-3-methylpyrrol sicherstellten.

Es ist ein im Vergleich mit den übrigen „Hämopyrrolen" auffallend beständiges Öl (Sp. 18 *mm* 81°, 11 *mm* 74 bis 75°), das nur ganz langsam an der Luft in dünner Schicht schön rotviolett wird. In verdünnter Schwefelsäure löst es sich farblos, während sich die anderen „Hämopyrrole" mit zitronengelber Farbe lösen. Bei der Behandlung der schwefelsauren Lösung mit Natriumnitrit entsteht ohne Verlust eines Kohlenstoffatoms ein Oxim $C_7H_{10}O_2N_2$, dem eine der beiden Formeln

```
H3C — C = C — C2H5                    H3C — C = C — C2H5
      |   |              oder                  |   |
     OC   C = N . OH              HO N = C     CO
       \ /                                 \ /
        N                                   N
        H                                   H
```

zukommen muß.

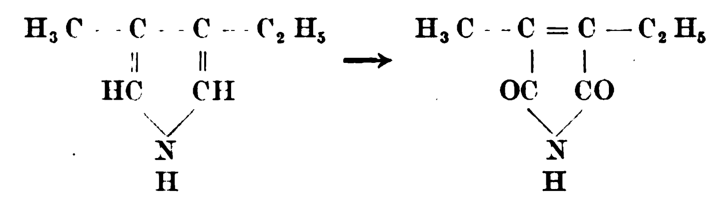
Das Oxim fällt zunächst in Form eines rotgefärbten Öles aus, das im Eis bald kristallinisch erstarrt, dann kann das farblose Oxim in Äther aufgenommen werden, während der rote Begleiter ungelöst zurückbleibt. Die getrocknete ätherische Lösung hinterläßt

[1]) *Piloty* und *Stock*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **392**. 232.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1820 (1914).

nach Verdampfen des Lösungsmittels das Oxim als Sirup, der bald zu kristallisieren beginnt. Dann kann man in heißem Wasser aufnehmen, wobei ein Harz zurückbleibt, während die mit Tierkohle geklärte wässerige Lösung das Oxim beim Abkühlen in Eis in Form kleiner, sehr dünner, länglicher an den Ecken eingekerbter, nahezu farbloser Blättchen ausfallen läßt. Der Schmelzpunkt derselben liegt bei 197 bis 198°. Bemerkenswert ist, daß dieses Oxim weder mit dem aus Hämo-, noch mit dem aus Kryptopyrrol entstehenden Oxim identisch ist.

Bei der Oxydation des 3.4-Methyläthylpyrrols in schwefelsaurer Lösung durch Chromsäure bei niederer Temperatur (2 *g* gelöst in 60 *cm*³ 30%iger H_2SO_4, dazu 9 *g* CrO_3 in 35 *cm*³ H_2O) wird in guter Ausbeute (0·5 *g*) das Imid der Methyläthylmaleinsäure erhalten.



Hämopyrrol oder 2.3-Dimethyl-4-äthylpyrrol $C_8H_{13}N$ wird aus der Fraktion *A* der Pikrate (71·5 *g*) erhalten, nachdem aus der zehnfachen Menge Alkohol umkristallisiert worden ist. Zu diesem Zweck wird das gepulverte Pikrat mit 715 *g* siedendem Alkohol übergossen und so lange in einem heftig siedenden Wasserbade unter Umschwenken belassen, bis alles in Lösung gegangen ist, was nach längstens einer Minute der Fall ist, worauf unter der Wasserleitung rasch abgekühlt wird, so daß das Pikrat nur wenige Minuten mit dem heißen Alkohol in Berührung bleibt. Auf diese Weise wird eine Zersetzung des Pikrates, die beim Kochen in allen Lösungsmitteln ziemlich rasch eintritt, fast völlig vermieden. Die Flüssigkeit bleibt hellgelblichrot. Nach dem Abkühlen wird noch etwa eine halbe bis dreiviertel Stunden im Eis stehen gelassen und dann das abgeschiedene Pikrat abgesaugt. Man erhält so 60 *g* vom Schmelzpunkt 121°; letzterer steigt auf 124° nach nochmaligem Umkristallisieren aus siedendem Alkohol.

Es liegt nun nahezu reines Hämopyrrolpikrat vor, aus dem nach der Zerlegung mit Natronlauge, wie beim 3.4-Methyläthylpyrrol angegeben ist, das Hämopyrrol gewonnen werden kann. Es ist ein durch Luft und Licht leicht veränderliches Öl, das durch Abkühlung mit Eis rasch fest wird und dann bei etwa 16° schmilzt. Der Sp. bei 12·5 *mm* liegt bei 87 bis 88·5°. Sein Geruch erinnert zugleich an Indol und an Naphthalin. Mit Sublimat gibt die essigsaure Lösung des Hämopyrrols einen weißen, amorphen Niederschlag von der

Zusammensetzung $(C_8H_{12}N_2)_2Hg, 4\,HgCl_2$; es läßt sich mit Aldehyden kondensieren, worauf auch die Fichtenspanreaktion beruht, an der also im Holz vorhandene Stoffe mit Aldehydcharakter beteiligt sind, und gibt also auch die Reaktion mit dem Reagens von *Ehrlich* (Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure) intensiv.

Als Hauptprodukt der flüchtigen Spaltstücke des Hämins auftretend, ist anzunehmen, daß weitaus der größte Teil des Methyläthylmaleinimides, das *W. Küster*[1]) zuerst bei der Oxydation des Gemisches der dem Hämin entstammenden Pyrrole erhielt, auf den Gehalt an Hämopyrrol zurückzuführen ist. Hiedurch wurde die β-β'-Substitution durch Methyl und Äthyl bewiesen und durch die weitere Feststellung, daß bei der Bildung des Hämopyrrols eine Abspaltung von Kohlendioxyd nicht eintrat, die Unabhängigkeit der Pyrrole von der Hämatinsäure dargetan, d. h. es wurde bewiesen, daß im Hämin zwei Pyrrolkerne vorhanden sind, die bei der Oxydation Hämatinsäure liefern und zwei weitere Pyrrolkerne, die bei der Reduktion Hämopyrrol geben. Natürlich liefert auch das reine Hämopyrrol bei der Oxydation das „Imid" und auch auf dem Wege über das Oxim kann es erhalten werden. Aus der schwefelsauren Lösung des Hämopyrrols fällt auf Zugabe von Natriumnitrit ein hochroter kristallisierter Niederschlag aus, dessen Bestandteile durch heißes Wasser getrennt werden können. Ungelöst bleibt ein zinnoberroter, feinpulveriger Stoff, der aus Alkohol in winzig kleinen, hochroten Würfeln und Oktaedern kristallisiert. Über seine Natur kann noch nichts ausgesagt werden. Das O x i m d e s H ä m o p y r r o l s $(C_7H_{10}O_2N_2)$[2]) fällt beim Erkalten der wässerigen Lösung in rhombischen Tafeln und breiten Blättern von Perlmutterglanz aus; es ist in kaltem Alkohol sehr leicht löslich und schmilzt bei 221·5°[2]). Aus dem Oxim, bei dessen Bildung also die α-ständige Methylgruppe wegoxydiert wird, läßt sich dann durch Verseifung mit verdünnter Schwefelsäure das „Imid" erhalten:

```
H3C — C — C — C2H5          H3C — C = C — C2H5
      ||  ||                      |   |
H3C — C   CH       ——→           OC   C = NOH
       \ /                         \ /
        N                           N
        H                           H
```

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**. 2953 (1904); *Liebigs* Ann. d. Chemie. **346**. 1 und 23; Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**. 526 (1908).

[2]) *Piloty* und *Stock*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **392**. 238 (1912). Nach einer früheren Angabe liegt der Schmelzpunkt bei 206 bis 207°. Ann. **366**. 254 (1909).

oder

```
H3C—C=C—C2H5             H3C — C  =  C — C2H5
    |  |                       |      |
HON=C  C=O       ⟶            OC     CO
     \/                         \    /
     N                            N
     H                            H
```

Die Synthese des Hämopyrrols wird später beschrieben werden (vgl. S. 290); hier sei zunächst die weitere Trennung und Aufarbeitung der Pikrate beschrieben, welche aus dem Pyrrolgemisch nach der Spaltung des Hämins erhalten worden waren.

Fraktion *B*. Die bei der zweiten Fällung mit ätherischer Pikrinsäurelösung erhaltenen 49·4 *g* repräsentieren im wesentlichen das Pikrat des

Kryptopyrrol

wie *H. Fischer*[1]) das 3.5-Dimethyl-4-äthylpyrrol genannt hat, da seine Auffindung erhebliche Schwierigkeiten gemacht hat. Es wird aus der Fraktion *B* durch eine Umkristallisation aus siedendem Alkohol im Verhältnis 1:46 in der beim Hämopyrrolpikrat beschriebenen Weise oder durch Umkristallisation aus 40 Teilen Benzol erhalten. Die 49·4 *g* werden also in 2270 cm^3 siedenden Alkohols gelöst, aus welcher Lösung sich nach dem Abkühlen und nach dem Animpfen mit reinem Kryptopyrrolpikrat 19·75 *g* Pikrat in schönen Nadeln abscheiden, die nach dem Trocknen bei 136° schmelzen. Durch nochmaliges Umkristallisieren steigt der Schmelzpunkt auf 138 bis 139°. Die in der alkoholischen Mutterlauge befindlichen Pikrate lassen sich durch partielles Auskristallisieren nicht voneinander trennen. Man müßte also nach Wiedergewinnung der Pyrrole den ganzen Gang durch partielle Fällung mittels ätherischer Pikrinsäurelösung, der von *Willstätter*[2]) eingeführt worden ist, wiederholen.

Das aus dem reinen Pikrat isolierte Kryptopyrrol ist ein Öl, das in allen Eigenschaften dem Hämopyrrol gleicht, es ist aber bis jetzt nicht gelungen, das Öl zum Erstarren zu bringen; sein Sp. 13 *mm* liegt bei 84 bis 85°. Das Oxim des Kryptopyrrols, bei dessen Darstellung ein rot gefärbtes Nebenprodukt nicht beobachtet wurde, schmilzt nach *Piloty* bei 215°[3]) und kristallisiert aus Wasser in schlanken, prismatischen Nadeln, ist also verschieden von dem aus Hämopyrrol erhaltenen Oxim, gibt aber bei der Verseifung Methyläthylmaleinimid wie jenes.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1979 (1912) mit *E. Bartholomäus*.

[2]) *Liebig*s Ann. d. Chem. **385**. 192 (1911).

[3]) *Knorr* und *Hess* (Ber. **44**. 2764) geben 201° an für das Oxim aus dem synthetisch bereiteten Kryptopyrrol.

Die bei der fraktionierten Fällung des durch Spaltung des Hämins entstandenen Pyrrolgemisches erhaltene dritte Fraktion *C* (76 *g*) enthält neben reichlichen Mengen von Pikrinsäure in erster Linie Phyllopyrrolpikrat. Zur Entfernung der Pikrinsäure wird zunächst in der fünffachen Menge Alkohol heiß gelöst, wonach beim Stehen in Eis 35 *g* eines Pikratgemisches auskristallisieren, das bei 90° schmilzt. Hieraus werden die Pyrrole regeneriert und fraktioniert destilliert, wobei die Hauptmenge bei 15 *mm* Druck bei 95 bis 96° übergeht und in der Vorlage vollständig erstarrt. Nach Abpressen zwischen gehärtetem Filtrierpapier unter hohem Druck bleiben 3·2 *g* Phyllopyrrol, aber noch nicht ganz rein, zurück, da die alkoholische Lösung die Reaktion mit *Ehrlichs* Reagens noch gibt, was auf die Anwesenheit trisubstituierter Pyrrole hinweist. Zur völligen Reinigung wird daher das Phyllopyrrolpräparat entweder von neuem in das Pikrat übergeführt oder es wird das Auskupplungsverfahren mit Diazobenzolsulfosäure angewendet[1]). Das Pikrat erhält man durch Eintragen von 1 *g* des festen Pyrrols in eine Lösung von 1·6 *g* Pikrinsäure in 30 cm^3 Äther, dem einige Tropfen Wasser zugesetzt worden sind; es kristallisiert dann in nahezu quantitativer Ausbeute (2·1 *g*) heraus und zeigt den Schmelzpunkt 106°.

Die Entfernung der trisubstituierten Pyrrole kann auch durch ihre Überführung in Azofarbstoffe dadurch geschehen, daß man die ätherische Lösung des noch unreinen Phyllopyrrols mit einer 1%igen Lösung von Diazobenzolsulfosäure unter Zusatz von Salzsäure erschöpfend ausschüttelt. Nach Entfernung des Äthers wird dann der Rückstand sodaalkalisch gemacht und das gereinigte Phyllopyrrol mit Wasserdämpfen abgetrieben, wobei es schon im Kühler erstarrt.

Das **Phyllopyrrol** oder 2.3.5-Trimethyl-4-äthylpyrrol wurde von *R. Willstätter* und *Asahina*[2]) als Spaltstück des Hämins zuerst aufgefunden und kann auch durch Reduktion von Chlorophyllderivaten erhalten werden, was in seiner Benennung zum Ausdruck kommt. Im reinsten Zustande erhält man es durch Sublimation im Vakuum in Form von großen, harten, viereckigen Platten, die sich zerstoßen lassen und bei 69° schmelzen. Der Sp. 12 *mm* liegt bei 86 bis 87°. Es ist außerordentlich licht- und luftempfindlich, unter Rötung verwandelt es sich in ein braunes Öl und in ein erhärtendes Harz. Überhaupt sind bemerkenswerterweise alle tetraalkylsubstituierten Pyrrole weniger beständig als die trisubstituierten, und diese werden leichter verändert als die bisubstituierten.

---

[1]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 467 (1912).

[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **385**. 188 (1911).

Phyllopyrrol gibt weder eine Fällung mit Sublimatlösung, noch die Fichtenspanreaktion oder die mit dem Reagens von *Ehrlich*, noch die Bildung eines Azofarbstoffes mit Diazoverbindungen, so daß das Ausbleiben dieser Reaktionen darauf hinweist, daß an den Pyrrolkohlenstoffatomen freier Wasserstoff nicht vorhanden ist. Sehr auffällig ist das Ausbleiben einer Fällung mit Quecksilberchlorid, denn man hatte bisher angenommen, daß hiebei der Imidwasserstoff substituiert wird, was also nicht zutrifft, denn solcher ist auch im Phyllopyrrol vorhanden, wie aus der glatten Bildung einer Kaliumverbindung geschlossen werden kann. Daß aber trotz des Versagens der bekannten Pyrrolreaktionen das Phyllopyrrol doch ein Pyrrol ist und nicht etwa ein Hexahydromethylindol, bewies *Willstätter*[1]) durch die Überführung in ein Pyrrolidin, wobei vier Atome Wasserstoff addiert werden. Diese Reduktion vollzieht sich in zwei Phasen. Zunächst werden 5 *g* Phyllopyrrol mit 12·5 *g* Jodwasserstoffsäure (1·96) und 1·25 *g* Phosphor auf 240 bis 250° erhitzt, wonach ein intensiv kampferartig und zugleich narkotisch riechendes, bei 725 *mm* Druck bei 160 bis 162° siedendes Produkt vorliegt, das ein Gemisch ungefähr gleicher Teile von Pyrrolin und Pyrrolidin vorstellt. Dieses Präparat wird mit Platinmohr vermischt und mit Wasserstoff behandelt, wonach die saure Lösung der Base ganz beständig gegen Kaliumpermanganat geworden ist. Das Phyllopyrrolidin geht bei der Destillation über Bariumoxyd zwischen 160 bis 164° als leicht bewegliche Flüssigkeit über ($d_4^0 = 0{\cdot}843$, $d_4^{20} = 0{\cdot}824$); ihr Geruch ist piperidinähnlich, nicht mehr kampferartig. In kaltem Wasser ist sie leichter löslich als in warmem. Mit wässeriger Pikrinsäurelösung gibt sie eine ölige Fällung.

Schließlich ist es aber auch gelungen, das Phyllopyrrol zum Methyläthylmaleinimid zu oxydieren, allerdings mit geringen Ausbeuten[2]).

1 *g* Phyllopyrrol wird in 20 *cm*³ 50%iger Schwefelsäure gelöst, 30 *cm*³ Wasser zugegeben und bei 50° unter Rühren innerhalb einer halben Stunde 20 *g* Bleidioxyd eingetragen. Man läßt bis zum anderen Morgen bei der angegebenen Temperatur weiter rühren, äthert dann die saure Lösung aus und dampft den Äther im Vakuum ab. Der Rückstand wird mit Soda aufgenommen und ausgeäthert. Die ätherische Lösung hinterläßt dann das „Imid" (0·05 *g*).

* * *

Die Gewinnung der sauren Spaltstücke des Hämins, welche sich bei der Reduktion mit Eisessigjodwasserstoff bilden, wird auf

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **385**. 215 (1911).

[2]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 404 (1912).

folgendem Wege ausgeführt[1]): Nach dem Übertreiben der Pyrrole mit Wasserdampf (vgl. S. 270) wird die sodaalkalische Lösung vom Eisenschlamm, der übrigens noch polymerisierte Pyrrole enthält, durch Absaugen getrennt, das Filtrat eben kongosauer gemacht und vier- bis fünfmal ausgeäthert. Der Rückstand der ätherischen Lösung, vom Äther durch Erhitzen im siedenden Wasserbade vollständig befreit, beträgt 25 bis 30 *g* bei Verwendung von 50 *g* Hämin. Er wird in 500 cm^3 absoluten Methylalkohols aufgenommen und die Lösung mit getrocknetem Chlorwasserstoffgas gesättigt. Damit die Veresterung der Säuren vollständig wird, bleibt die Lösung einen Tag stehen, worauf sie im Vakuum bei 40° Badtemperatur eingedampft wird. Der jetzt erhaltene Rückstand wird mit Soda alkalisch gemacht und dann zwei- bis dreimal ausgeäthert. (Aus der Sodalösung läßt sich nach dem Ansäuern (Kongopapier!) durch Ausäthern eine bald größere, bald kleinere Menge an unverestertem Säuregemisch gewinnen.) Der Rückstand des Ätherauszuges der Ester wird nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum destilliert, wobei die Ölbadtemperatur bis 220° steigt. Beim Stehen des in einer Ausbeute von 24 *g* erhaltenen Destillates in der Kälte kristallisiert nun der Ester der Phonopyrrolkarbonsäure, und zwar in etwa 6 *g* betragender Menge aus und kann durch Absaugen ohne Filter von dem ölig gebliebenen Estergemisch getrennt werden. Zur weiteren Reinigung werden die Kristalle zwischen gehärtetem Filtrierpapier unter hohem Druck abgepreßt.

Die Trennung der in der öligen Mutterlauge befindlichen Ester bewerkstelligt man nach der Umwandlung in die Pikrate, zu welchem Zweck man 11 *g* des Gemisches mit 220 cm^3 10%iger feuchtätherischer Pikrinsäurelösung versetzt, worauf in Eis gestellt wird. Es scheiden sich dann 18·5 *g* Pikrat aus[2]), die man nun in 140 cm^3 Essigester löst, worauf man wieder bei niederer Temperatur stehen läßt. Im Verlauf einer Stunde kristallisiert dann das Pikrat des Phonopyrrolkarbonsäuremethylesters (5·4 *g*) aus, das durch braune Farbe ausgezeichnet ist und bei 120 bis 121° schmilzt. Gewöhnlich sind ihm nur geringe Mengen des gelben Pikrats des Isoesters beigemengt, das man aus dem Filtrat durch Verdampfen des Essigesters und Umkristallisation des Rückstandes aus 60 cm^3 96%igen Alkohols im Betrage von 5·3 *g* erhält. Dieses Pikrat schmilzt bei 112 bis 113°[3]).

[1]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1921 (1912); *H. Fischer* und *H. Rose*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 791 (1914).

[2]) In der Mutterlauge befindet sich das Pikrat eines Esters, das nach der Umkristallisation aus Alkohol bei 95° schmilzt; es handelt sich um den Ester der Trimethylpyrrolpropionsäure (vgl. S. 282).

[3]) Nach *Piloty* bei 105 bis 106°.

Aus den Pikraten lassen sich zunächst die Ester nach Zerlegung mit Natronlauge in Äther überführen, worauf der Rückstand der ätherischen Lösung durch Jodwasserstoff verseift wird. Auf 9 *g* des Pikrats verwendet man hiezu 25 cm^3 Jodwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1·96) und 25 cm^3 Wasser und erhitzt zwei Stunden im siedenden Wasserbade, destilliert die Säure im Vakuum ab, macht den Rückstand mit Soda alkalisch, um dann durch Ausäthern Spuren unverseiften Esters zu entfernen, worauf kongosauer gemacht und nun die Säure in Äther überführt wird. Schließlich wird der Rückstand dieser ätherischen Lösung (3·3 *g*) aus siedendem Wasser umkristallisiert.

Die **Phonopyrrolkarbonsäure** $C_9H_{13}O_2N$ wurde zuerst von *Piloty*[1]) als Spaltstück des Hämatoporphyrins durch Reduktion mit Zinn und Salzsäure erhalten und als Hämopyrrolkarbonsäure bezeichnet. Der jetzige Name wurde später von *Piloty*[2]) gewählt, weil das bei Abspaltung von Kohlendioxyd daraus entstehende Pyrrol, Phonopyrrol genannt, nicht mit Hämopyrrol identisch war. Schließlich ergab sich aber, daß bei schneller Destillation der „Phonopyrrolkarbonsäure" doch Hämopyrrol entsteht[3]), während sich das Phonopyrrol als ein Gemisch von 2.3-Dimethyl-5-äthyl- mit 2.3.5-Trimethylpyrrol erwiesen hat[4]). Das durch Abspaltung von Kohlendioxyd gebildete Äthyl wandert also zugleich von der β-(4)- in die α-Stellung; statt Kohlendioxyd spaltet sich aber auch Essigsäure ab (wobei natürlich auch anderweitige Zersetzungen stattfinden müssen), und so bildet sich statt Äthyl Methyl, das aber gleichfalls von Stellung 4 nach 5 wandert.

So steht jetzt nichts mehr im Wege der Phonopyrrolkarbonsäure, die Konstitution einer 2.3-Dimethylpyrrol-4-propionsäure zuzuweisen und ihr den ursprünglich gewählten Namen wieder zu erteilen. Der Isophonopyrrolkarbonsäure käme dann die Konstitution einer 3.5-Dimethylpyrrol-4-propionsäure und der Name „Kryptopyrrolkarbonsäure" zu. Übrigens scheint auch eine Wanderung des Methyls von der α- in die α'-Stellung stattfinden zu können, da der Ester der Bilirubinsäure bei der Destillation sowohl Phono- wie Isophonopyrrolkarbonsäure gibt.

Die Hämopyrrolkarbonsäure kristallisiert in büschelartig vereinigten Nadeln aus heißem Wasser, löst sich ziemlich leicht in Benzol und Äther, leicht in Alkohol, Alkalien und Säuren; sie schmilzt bei 131°, während die ebenfalls schön kristallisierende

---

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **366.** 255 (1909).

[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **377.** 316 (1910).

[3]) *Piloty, Stock* und *Dormann*: Ebenda. **406.** 342 (1914).

[4]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45.** 1922 (1912).

isomere Säure bei 140° schmilzt[1]). Die Pikrate der Säuren werden durch Eintragen fein gepulverter Pikrinsäure in die feucht ätherische Lösung der Säure erhalten (auf 4·3 *g* berechnen sich 6 *g* Pikrinsäure) und durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt. Die Schmelzpunkte[2]) liegen bei 148 bezw. 155 bis 156°. Aus den Pikraten werden die freien Säuren entweder durch Zerlegung mit der berechneten Menge n-Natronlauge[3]) oder nach Zersetzung durch Salzsäure auf folgendem Wege gewonnen[4]):

16 *g* reines Pikrat werden in zirka 400 *cm*³ Äther suspendiert und mit 25 *cm*³ 25%iger Salzsäure gut durchgeschüttelt. Nach kurzer Zeit befindet sich die Pyrrolkarbonsäure in der Säure, die Pikrinsäure im Äther. Letzteren schüttelt man noch zweimal mit je 10 *cm*³ Salzsäure aus, dann wird der vereinigte salzsaure Extrakt noch dreimal mit Äther extrahiert. Nun stumpft man zur eben noch sauren Reaktion auf Kongo ab (rotes Kongopapier darf nur eben schwärzlichgrün werden), wobei ein Teil der Pyrrolkarbonsäure auskristallisiert. Unbekümmert um diese Abscheidung extrahiert man die Säure erschöpfend mit Äther und destilliert ihn im Vakuum ab. Es hinterbleiben 6·5 *g* kristallisierte, analysenreine Säure.

Die Oxime der Phonopyrrolkarbonsäure entstehen durch die Einwirkung von salpetriger Säure. 6 *g* der Säure werden in einem Überschuß verdünnter Schwefelsäure gelöst und zu der Lösung rasch hintereinander in kleinen Portionen so viel von einer konzentrierten Natriumnitritlösung hinzugefügt, bis sich in einer klaren, abgekühlten Probe auf erneuten Zusatz von Nitrit kein Niederschlag mehr ausscheidet. Man leitet die Operation so, daß die Temperatur der Flüssigkeit nicht über 50° steigt und nicht unter 30° sinkt. Die Lösung färbt sich anfangs hellrot, und bald beginnt die Abscheidung von Kristallen in einer Ausbeute von zirka 50% der verwendeten Säure. Man kristallisiert die Substanz unter Zuhilfenahme von etwas Tierkohle aus viel heißem Wasser um[5]).

Das Oxim der Phonopyrrolkarbonsäure ($C_8 H_{10} O_4 N_2$) kristallisiert in auf beiden Seiten scharf zugespitzten Blättchen, schmilzt unter lebhafter Gasentwicklung bei 242°, nachdem bei 205° Braunfärbung, von 221° an Sintern eingetreten ist[6]). In Wasser löst es sich im Verhältnis 1:110, in kaltem und heißem Alkohol ist es sehr schwer, in Äther nicht löslich, in Bi-

---

[1]) *Piloty* gibt 129° bezw. 125° als die Schmelzpunkte an.

[2]) *Piloty* gibt 162 bis 163° bezw. 150° als die Schmelzpunkte an.

[3]) *Piloty* und *Thannhauser*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **390**. 206 (1912).

[4]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1921 (1912).

[5]) *Piloty*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **366**. 263 (1909).

[6]) *Piloty* gibt 246° an.

karbonat löst es sich unter Kohlensäureentwicklung. Durch Hydrolyse bildet sich Hämatinsäure, und diese läßt sich denn auch in einer Ausbeute von zirka 25% der verwendeten Pyrrolkarbonsäure aus der Mutterlauge des Oxims durch Ausäthern gewinnen.

Das Oxim der Isophonopyrrolkarbonsäure schmilzt bei 219°[1]), ist also dem vorigen isomer, und somit hat die Stellung des Methyls einen Einfluß auf den Ort der Isonitrosogruppe. Ob sie aber an Stelle eines Methyls tritt oder ob sie die Nähe des Propionsäureesters aufsucht, ist noch nicht entschieden. Es ist also noch zweifelhaft, welche der beiden möglichen Formeln I und II den beiden Oximen zukommt.

```
H3C — C = C — CH2 — CH2 — COOH
      |  I  |
HON = C     CO
       \   /
         N
         H
```

und

```
H3C — C = C — CH2 — CH2 — COOH
      |     |
  O = C     C = NOH
       \   /
         N
         H
```

Die Darstellung eines Azofarbstoffes aus der Phonopyrrolkarbonsäure beschreiben *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*[2]) wie folgt:

1·5 *g* der Säure werden in möglichst wenig Alkohol gelöst und zu dieser Lösung eine solche von 1·5 *g* Diazobenzolsulfonsäure und 3 cm^3 Salzsäure (1 : 3) in 150 cm^3 Wasser unter guter Kühlung hinzugegeben. Beim tüchtigen Durchschütteln scheidet sich bald der Azofarbstoff in kleinen Nädelchen von gelbroter bis oranger Farbe in einer Ausbeute von 2·7 *g* aus. Löst man den Farbstoff ($C_{15}H_{17}O_5N_3S$) in n/10-Natronlauge und versetzt die Lösung mit Salzsäure, so kristallisiert er nur sehr langsam aus; danach und nach allen sonstigen Eigenschaften gehört er unzweifelhaft der α-Reihe an (vgl. S. 286).

Die Destillation der Phonopyrrolkarbonsäure[2]).

6·5 *g* reine Säure werden im Ölbade langsam in einem Fraktionierkolben erhitzt. Bei zirka 180° erfolgt Gasentwicklung,

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 794 (1914).

[2]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1922 (1912).

die gegen 200° lebhaft wird, bei 220° beginnt dann die Destillation eines Öles, wobei auch Wasserabspaltung eintritt. Bei 250 bis 280° geht die Hauptmenge über, im ganzen dauert die Operation zwei Stunden. Aus dem Destillat wurde durch ätherische Pikrinsäurelösung eine geringe Menge Ammonpikrat gefällt, die dunkel gefärbte Mutterlauge durch Natronlauge von der Pikrinsäure befreit und dann mit Diazobenzolsulfonsäure mineralsauer ausgekuppelt. Erhalten wurden 0·7 *g* kristallisierter Farbstoff, während zum Auskuppeln 1·5 *g* Diazobenzolsulfonsäure nötig sind. Nach dem Lösen in n/10 Natronlauge und Versetzen mit dem gleichen Volumen Alkohol und Ansäuern mit Salzsäure erhält man den Farbstoff in dunkelrotbraunen, büschelförmig vereinigten Nadeln. Alle Eigenschaften weisen darauf hin, daß der Azorest in die β-Stellung eingegriffen hat (vgl. S. 286); nach den analytischen Ergebnissen handelt es sich aber um ein Gemisch der Farbstoffe aus 2.3-Dimethyl-5-äthyl- und 2.3.5-Trimethylpyrrol (vgl. S. 289).

Aus der Zugehörigkeit des Farbstoffes zur β-Reihe geht mit Sicherheit hervor, daß bei der Destillation eine Abwanderung von der β-in die α-Stellung erfolgt ist, da ja die Phonopyrrolkarbonsäure selbst einen der α-Reihe zugehörigen Farbstoff gibt. Auch weist eine synthetisch erhaltene, der Phonopyrrolkarbonsäure isomere Säure andere Eigenschaften auf. Es handelt sich um die 3.5-Dimethylpyrrol-2-propionsäure, welche aus der nach der *Knorr*schen Synthese gewonnenen 3.5-Dimethyl-4-karbäthoxypyrrol-2-propionsäure durch Abspaltung des veresterten Karboxyls hergestellt wurde[1]). Es wurden also zunächst Isonitroso-γ-azetylbuttersäure (1 *g*), Azetessigester (0·8 *g*) und Eisessig (12·5 cm^3) mit Zinkstaub (3·1 *g*) in Reaktion gebracht:

```
                        H3C — CO        H2C — COOR
                              |     +    |
COOH — CH2 — CH2 — C              OC — CH3        ⟶
                           ⟍
                            N
                            OH

                        H3C — C     C — COOR
                              ||    ||
⟶  COOH — CH2 — CH2 — C  —  C — CH3
                              ⟍  ⟋
                               N
                               H
```

Die neue Estersäure kommt beim Ansäuern der sodaalkalischen Lösung zuerst als Öl heraus, das bald kristallisiert. Beim Um-

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1925 (1912).

kristallisieren aus verdünntem Methylalkohol erhält man sie in farblosen Nädelchen, die unter Zersetzung bei 119 bis 120° schmelzen (Ausbeute bis zu 48%). Sie ist in Wasser, Äther und Chloroform schwer, in Alkohol, Azeton und Eisessig leicht, in Ligroin nicht löslich. Die Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd tritt bei ZT. nicht ein, erst beim Erhitzen ist sie positiv. Werden 5 *g* dieser Estersäure mit 5 cm^3 Schwefelsäure (1: 3) und 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure zirka eine halbe Stunde lang auf dem Wasserbade erhitzt, bis die Entwicklung von Kohlendioxyd aufgehört hat, so wird die Karbäthoxygruppe verseift und dann CO_2 abgespalten. Nach dem Abkühlen verdünnt man mit Wasser, macht mit Soda alkalisch und äthert zur Entfernung neutraler Zersetzungsprodukte ungefähr fünfmal aus. Dann wird gegen Kongo schwach sauer gemacht und erschöpfend mit Äther extrahiert, worauf der Äther sofort im Vakuum bei ZT. verdampft wird. Den Rückstand behandelt man mit absolutem Äther und filtriert. Das Filtrat wird alsdann nach Zusatz des drei- bis vierfachen Volumens Petroläther gut durchgeschüttelt, abermals filtriert und das Filtrat sofort im Vakuum bei ZT. eingedampft. Die entstandene 3.5-Dimethylpyrol-2-propionsäure konnte noch nicht kristallisiert erhalten werden; auch gibt sie kein Pikrat. Sie ist aber durch den mit Diazobenzolsulfonsäure entstehenden, schön kristallisierenden Azofarbstoff gut zu charakterisieren. Hiezu wird 1 *g* der Säure in wenig Alkohol gelöst und die Lösung zu einem Gemisch von 1 *g* Diazobenzolsulfonsäure, 100 cm^3 Wasser und 6 cm^3 n-Salzsäure hinzugegeben, und unter Kühlung gut durchgeschüttelt, woiauf dann sehr bald die Abscheidung des braunen Farbstoffes in fast quantitativer Ausbeute erfolgt. Nach Auflösen in möglichst wenig n/10-Natronlauge und Zusatz von etwas mehr als der gleichen Menge n/10-Salzsäure kristallisiert er in wetzsteinförmigen Gebilden, die zum Teil büschelförmig angeordnet sind. Dieser Farbstoff zeigt die Reaktionen eines β-Azofarbstoffes.

Außer der Hämo- und Kryptopyrrolkarbonsäure wird bei der reduktiven Spaltung des Hämins noch eine dritte Säure erhalten, die sich als Trimethylpyrrol-4-propionsäure erwiesen hat und also auch als Phyllopyrrolkarbonsäure bezeichnet werden kann. Sie wurde zuerst von *Piloty* und *Dormann* beschrieben[1]). Bei dem von *H. Fischer* ausgearbeiteten Trennungsverfahren bleibt das Pikrat ihres Esters in den Mutterlaugen (vgl. S. 277, Anm.). Werden aus diesen Pikraten die Ester regeneriert und darauf mit Äthylat erhitzt, so werden die beiden trisubstituierten Säuren in α- (2- bezw. 5-) Stellung äthyliert und liefern dann nur langsam ein Pikrat, besonders bei Gegenwart von Phyllopyrrolkarbonsäure, so daß die

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 1007 (1913).

Abtrennung der letzteren in Form des Pikrates ermöglicht wird (*H. Fischer* und *H. Röse*[1]).

11 *g* des Estergemisches werden zunächst durch Erhitzen mit Methylat im Wasserbade verseift und die freien Säuren mit 50 *g* Kalium, gelöst in 290 *cm*³ absolutem Alkohol, dreieinhalb Stunden auf 210° erhitzt, wobei der Druck bis auf 87 Atmosphären steigt. Nach dem Erkalten wird mit Wasser aufgenommen und der Alkohol durch mehrmaliges Ausäthern entfernt. Nach dem Ansäuern wird wieder ausgeäthert und der Ätherrückstand (zirka 5 *g*) mit Pikrinsäure ins Pikrat verwandelt (Ausbeute 3·6 *g*). Es schmilzt bei 124 bis 125° und gibt, mit Salzsäure in bekannter Weise zerlegt, eine Säure, deren Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 86 bis 87° liegt. Sie ist identisch mit der aus Phonopyrrolkarbonsäure durch Erhitzen mit Methylat erhaltenen Trimethylpyrrol-4-propionsäure.

Piloty[2]) gibt den Schmelzpunkt der Säure, die von ihm als Phonopyrrolkarbonsäure d bezeichnet wird, bei 81° liegend, den ihres Pikrates, linsenförmige Täfelchen, bei 128° liegend, an. Er hat auch eine bei 108° schmelzende, Xantho- oder Phonopyrrolkarbonsäure c genannte Säure, die aus Wasser in kurzen, an den Enden abgeflachten Prismen kristallisiert, aus den Spaltstücken des Hämins isoliert und spricht sie als eine α-Äthyl-β-methylpyrrol-β-propionsäure an. Ihr Pikrat schmilzt bei 142°. *H. Fischer*[3]) ist es nicht gelungen, diese Säure aufzufinden.

* * *

Die Anwendung der Methoden zur Aufspaltung der Porphyrine auf das Kot- und auf das Urinporphyrin führte zu folgenden Ergebnissen[4]):

1. Bei der totalen Reduktion des Kotporphyrinmethylesters durch Eisessigjodwasserstoff fehlt die Basenfraktion fast vollkommen, d. h. der Ätherextrakt hinterläßt beim Eindampfen einen geringfügigen öligen, an der Luft sich rasch rötenden Rückstand, der die *Ehrlich*sche Probe gibt; ein Pikrat ist aber nicht zu erhalten. Dagegen kann aus der kongosauer gemachten Lösung durch Ausschütteln mit Äther Phonopyrrolkarbonsäure in guter Ausbeute gewonnen werden, Isophonopyrrolkarbonsäure fehlt.

2. Wird Urinporphyrinmethylester in gleicher Weise reduziert, so wird wiederum kein mit Wasserdämpfen aus sodaalkalischer Lösung flüchtiges Pyrrol beobachtet; wird dann die Lösung mit Schwefelsäure bis zur schwärzlichen Verfärbung von rotem Kongo-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 190 (1914).
[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **406**. 373.
[3]) Ergebnisse der Physiologie. XV. Jahrg. 1916. S. 208.
[4]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 14 und 85 (1916).

papier versetzt und nun mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt im Wasserbade unter stark vermindertem Druck eingedampft und noch zwei bis drei Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, um Reste von Essigsäure zu entfernen, so hinterbleibt ein beträchtlicher Rückstand, der aber nicht kristallisiert und sich spielend in heißem Wasser löst. Hienach liegt keine Phonopyrrolkarbonsäure vor, aber doch eine Pyrrolkarbonsäure, da die Aldehydreaktion intensiv eintritt. Der Ester dieser Säure, die nach den Resultaten bei der Oxydation des Urinporphyrins (vgl. S. 268 und 269) als karboxylierte Phonopyrrolkarbonsäure aufgefaßt werden darf, siedet erst bei 230°.

3. Bei der Aufspaltung des Kotporphyrins durch Kaliummethylat im Autoklaven bei 240° und 64 Atmosphären Druck wird außer einem kristallisierenden, enorm empfindlichen Pyrrol, das weder mit Tri- oder Tetramethyl-, noch mit Phyllopyrrol identisch ist, Phyllopyrrolkarbonsäure erhalten.

Nach allem nimmt das Kotporphyrin eine Mittelstellung zwischen dem Hämatin und dem Gallenfarbstoff ein, wonach die Ansicht, daß es sich in ihm um ein intermediäres Stoffwechselprodukt auf dem Wege Blut- zum Gallenfarbstoff handelt, eine Bestätigung erfährt. Mit den Porphyrinen teilt es die Fähigkeit zur Komplexsalzbildung und zur Bildung der Tetrachlor- und Tetrabromverbindung, ferner den Übergang zur Leukoverbindung bei der Reduktion mit Natriumamalgam, welche die *Ehrlich*sche Probe nicht gibt und die durch Luftoxydation wieder in den Farbstoff übergeht. An das Bilirubin erinnert die geringe Ausbeute an Pyrrolen bei der Reduktion sowie die glatte Bildung von Phyllopyrrolkarbonsäure bei der Aufspaltung durch Kaliummethylat. Das Fehlen der Basenfraktion spricht dafür, daß die beiden Sauerstoffatome, die im Kotporphyrin nicht in Form von Karboxylen vorkommen, in α- oder β-Stellung die Pyrrolkerne der „basischen" Molekülhälfte substituieren. An Blut- und Gallenfarbstoff gemeinschaftlich erinnert der oxydative Abbau, der Hämatinsäure liefert. Eine Überführung des Kotporphyrins in Mesoporphyrin unter gleichen Bedingungen, die beim Hämin oder Hämatoporphyrin zum Ziele führen, gelingt nicht, auch besitzt das Kotporphyrin außer dem Karboxyl noch ein Kohlenstoffatom mehr als Hämin, so daß an eine Methylierung im Organismus gedacht werden kann. Die Ähnlichkeit im Aufbau mit dem Hämin zeigt sich endlich wieder im Entstehen der Phonopyrrolkarbonsäure bei der Reduktion, das Herausschälen eines zweikernigen Pyrrolderivats, wie es die Bilirubinsäure vorstellt, ist weder beim Hämin, noch beim Kotporphyrin geglückt.

* * *

Während die sauren Spaltstücke des Hämins bisher nicht synthetisiert werden konnten, sind die basischen Bausteine, Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrol, auf synthetischem Wege dargestellt worden, wodurch auch ihre Konstitution einwandfrei festgestellt worden ist. Dabei wurde die Methode von *L. Knorr*[1]), bei der β-Ketonsäureester, β-Diketone, β-Ketoaldehyde und Ketone mit Isonitrosoketonen unter dem Einfluß von Zinkstaub und Essigsäure zu Pyrrolen zusammentreten, zweckentsprechend benützt oder dadurch modifiziert, daß in alkalischer Lösung gearbeitet wurde[2]), da es sich zeigte, daß z. B. Aminoketone mit Oxalessigester nur unter dieser Bedingung kondensiert werden konnten. Eine wichtige Rolle spielte die Reduktion des in den primären Produkten der Pyrrolsynthesen als Seitenkette vorhandenen Azetyls über das Hydrazon, bezw. das Azin[3]), ferner die Abspaltung der Propionylgruppe oder des Karboxyäthyls[4]) und die Alkylierung der Pyrrole durch Erhitzen mit Alkylaten[5]), wobei der Befund gemacht wurde, daß die α-Stellung leichter als die β-Stellung besetzt wird. Auch das Kapitel der Umlagerungen wurde gelegentlich dieser Untersuchungen bereichert und die leicht erfolgende Wanderung aus der β- in die α-Stellung festgestellt, nachdem ein unterscheidendes Merkmal dafür aufgefunden worden war, ob sich an einem trisubstituierten Pyrrol das freie Wasserstoffatom an einem α- oder an einem β-Kohlenstoffatom befindet. Dieses Merkmal lieferten die Azofarbstoffe, die aus den betreffenden Pyrrolen erhalten werden konnten. Hiezu sei zunächst erwähnt, daß sich die Kupplung mit Diazobenzolsulfonsäure als praktischer erwiesen hat als die mit einer nicht sauren Diazoverbindung, weil hier eine Abspaltung des Säurerestes, der mit den schwach basischen Azofarbstoffen intramolekulare Salzbildung gibt, natürlich nicht eintreten kann, während die salzsauren Salze der Azofarbstoffe leicht etwas Chlorwasserstoff abgeben[6]).

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chemie. **236**. 317 (1886); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**. 2998 (1902).

[2]) *Piloty* und *Wilke*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 2586 (1912).

[3]) *L. Wolff*: *Liebigs* Ann. **394**. 86 (1912).

[4]) *L. Knorr*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **236**. 320 (1886); *H. Fischer*: und *K. Eismayer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 1826 (1914).

[5]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 466 (1912); Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**. 185; **80**. 6.

[6]) *L. Marchlewski* stellte aus rohem Hämopyrrol mit Hilfe von Benzoldiazoniumchlorid Azofarbstoffe her, aus deren Analyse eine klare Folgerung über die Zusammensetzung nicht gezogen werden konnte. Der Hauptzweck der Arbeit: die Nichteinheitlichkeit des rohen Hämopyrrols und die Identität des Hämopyrrols aus Chlorophyll und aus Hämin zu erweisen, wurde doch erreicht. Extrait du Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie. A. **1905**. 279; **1909**. 555, 583; **1910**. 1; Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**. 176; **56**. 316 (1908); **61**. 276 (1909); **77**. 247 (1912); Biochem. Zeitschr. **10**. 437 (1908); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**. 259 (1910).

Ferner hat sich gezeigt, daß bisubstituierte Pyrrole schon mit der Diazobenzolsulfonsäure allein reagieren, während trisubstituierte Pyrrole erst nach Zusatz von Salzsäure aus ihrer ätherischen Lösung herausgekuppelt werden und tetrasubstituierte Pyrrole überhaupt nicht reagieren, so daß eine Trennung dieser Pyrrolderivate möglich ist. Die unterscheidenden Merkmale zwischen α- und β-Azofarbstoffen der Pyrrole bestehen endlich darin, daß α-Azofarbstoffe gegen Luft und Licht stark empfindlich sind und sich demgemäß nur schlecht umkristallisieren lassen. Sie schlagen mit Säuren im Vergleich mit β-Azofarbstoffen im Farbton nicht um; in sodaalkalischer Lösung auf Filtrierpapier gegossen, geben sie, mit diazotiertem Nitranilin betupft, eine eigenartige prachtvolle Farbenreaktion: Der Rand läuft purpurrot an und die ganze betupfte Fläche wird nach kurzer Zeit intensiv blau. Dieselbe Reaktion kann man auch durch andere Diazoverbindungen erzeugen, jedoch erscheint sie dann erheblich langsamer und nicht so ausgeprägt.

β-Azofarbstoffe sind relativ sehr beständig, lassen sich gut umkristallisieren, schlagen mit Säure nach Rot um und geben die Reaktion mit diazotiertem Nitranilin nicht (*Hans Fischer* und *E. Bartholomäus*[1]).

Zum Schluß dieser Übersicht, für welche die folgenden Synthesen Belege geben, sei nochmals darauf hingewiesen, daß bei dem Versuch, Kohlendioxyd aus längeren Seitenketten abzuspalten, Essigsäure heraustreten kann, so namentlich bei der Trimethylpyrrol-4-propionsäure, die demnach statt des erwarteten Phyllopyrrols Tetramethylpyrrol lieferte, während 3.5-Dimethyl-2-propionsäure die ganze Seitenkette verlor und 3.5-Dimethylpyrrol ergab[2]).

Synthese des 3.5-Dimethylpyrrol-2.4-dikarbonsäureesters[3]).

56 *g* Azetessigester werden in 312 cm^3 Eisessig gelöst, die Lösung stark gekühlt und 16 *g* Natriumnitrit, in möglichst wenig Wasser gelöst, eingetragen. Das so gewonnene Gemisch, welches Azetessigester und Isonitrosoazetessigester in äquivalenten Mengen enthält, wird mit 200 *g* Zinkstaub portionsweise versetzt, wobei die Temperatur nur wenig steigen darf, doch erfolge das Eintragen nicht zu langsam. Sobald dann die ganze Zinkmenge eingetragen worden ist, wird zunächst auf dem Wasserbade angewärmt, sodann über freier Flamme bis zum Sieden erhitzt, worauf ein Zusatz von 200 cm^3 siedendem Wasser erfolgt und die siedende Lösung rasch abgesaugt wird. Das zurückbleibende Zink wird mit kleinen Portionen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**. 478 (1912); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1919 (1912).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 184 (1914).

[3]) *L. Knorr*: *Liebigs* Ann. d. Chem. **236**. 318 (1886); *L. Marchlewski*: Extrait du Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie. A. **1910**. 2.

siedender 70%iger Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird schließlich in 3 *l* kaltes Wasser gegossen, wobei der Ester in Form feiner, verfilzter Nadeln ausfällt. Nach dem Waschen mit Wasser wird er aus verdünntem Alkohol oder aus starker Essigsäure umkristallisiert. Nach diesem Verfahren erhält man etwa 35% des angewandten Azetessigesters an Dimethylpyrroldikarbonsäureester:

$$\begin{array}{ccccc} H_3C-CO & & H_2C-COOR & & H_3C-C-C-COOR \\ | & + & | & \longrightarrow & \quad \| \quad \| \\ ROOC-C=NOH & & OC-CH_3 & & ROOC-C \quad C-CH_3 \\ & & & & \diagdown \; \diagup \\ & & & & N \\ & & & & H \end{array}$$

Er ist unlöslich in Wasser, Säuren und Alkalien, ziemlich leicht löslich in Alkohol, Chloroform, Benzol, Toluol und Eisessig, schwer in Äther und Ligroin. Der Schmelzpunkt liegt bei 134 bis 135°. In konzentrierter Schwefelsäure löst er sich in der Kälte unverändert auf und kann aus dieser Lösung durch Wasser wieder abgeschieden werden. Beim Erwärmen tritt dagegen Verseifung ein und unter Entwicklung von Kohlendioxyd bildet sich ziemlich glatt 3.5-Dimethylpyrrol, das nach der Verdünnung und Übersättigen mit Soda durch Wasserdampf leicht abgetrennt werden kann.

Das 3.5-Dimethylpyrrol ist wenig löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther und Benzol. Nach dem Trocknen über Bariumoxyd siedet es bei 171°. Frisch destilliert ist es farblos, besitzt eine blaue, an Petroleum erinnernde Fluoreszenz und hält sich bei Luftabschluß lange unverändert. Bei Luftzutritt färbt es sich dagegen sehr bald rot und verwandelt sich schließlich in eine rote amorphe Masse.

H. Fischer[1]) hatte nun die Beobachtung gemacht, daß beim Erhitzen von Pyrrolen mit Alkylaten eine Alkylierung am Kohlenstoff eintritt; am 3.5-Dimethylpyrrol konnte er dann mit *E. Bartholomäus*[2]) zeigen, daß es leicht gelingt, in die α-Stellung Methyl oder Äthyl einzuführen, während die β-Stellung erheblichen Widerstand leistet.

Synthese von 3.5-Dimethyl-2-äthylpyrrol.

Ein Gemisch von 2·7 *g* 3.5-Dimethylpyrrol und einer Lösung von 1·4 *g* Natrium in 20 cm^3 absolutem Alkohol werden in einem Bombenrohr acht Stunden lang auf 210 bis 220° erhitzt. Den Inhalt der Röhre spült man dann in ein kleines Destillationskölbchen, leitet durch die Flüssigkeit einige Zeit Kohlendioxyd und treibt dann

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 466 (1912).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**. 185 (1912); **80**. 6. (1912).

mit Wasserdampf ab, worauf das Destillat dreimal ausgeäthert wird. Der gesamte Ätherauszug wird nun mit einer 1%igen Lösung von Diazobenzolsulfonsäure zur Entfernung von unverändertem Dimethylpyrrol durchgeschüttelt; das Ausbleiben der Bildung eines Azofarbstoffes unter diesen Bedingungen beweist, daß disubstituiertes Pyrrol nicht mehr vorhanden ist. Auf Zusatz von n-Salzsäure kristallisiert dann der Azofarbstoff des 3.5-Dimethyl-2-äthylpyrrols aus, denn seine Eigenschaften beweisen, daß er zur β-Reihe gehört, und aus der Menge — 5·7 *g* — geht hervor, daß 60% des verwendeten Dimethylpyrrols in α-Stellung äthyliert worden sind.

Die Mutterlauge des Azofarbstoffes wird dann weiter gekuppelt, bis in ihr unveränderte Diazobenzolsulfonsäure mittels R-Salz nachgewiesen werden kann. Dann wird die Flüssigkeit sodaalkalisch ausgeäthert, Pikrinsäure zu der feucht ätherischen Lösung zugesetzt und durch Eis gekühlt, worauf sich dann wenig eines Pikrats absetzt, das sich mit dem des 3.5-Dimethyl-2.4-diäthylpyrrols vom Schmelzpunkt 90° als identisch erweist.

Synthesen von Pyrrolen in alkalischer Lösung.

Die Methode von *Knorr*, bei der in essigsaurer Lösung gearbeitet wird, versagt für die Kombination von Aminoketonen mit Ketonen. *Piloty* und *Hirsch*[1]) fanden, daß sie sich in alkalischer Lösung bewerkstelligen läßt und daß diese Modifikation auch in solchen Fällen vorteilhaft angewendet werden kann, in welchen die ursprüngliche Ausführung nur umständlich zum Ziele führt.

Synthese von 3.4.5-Trimethylpyrrol.

20 *g* Aminoazetonchlorhydrat und 10 *g* Methyläthylketon werden in 100 cm^3 30%iger Kalilauge gelöst und das Gemisch 20 Tage stehen gelassen, wonach das Keton größtenteils verschwunden ist. Das gebildete Pyrrol wird nun mit Wasserdämpfen abdestilliert, das Destillat nach Zusatz von Ammonsulfat ausgeäthert, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und dann abdestilliert. Der Rückstand liefert dann bei der Destillation im Wasserstoffstrom bei 10 *mm* Druck ein zwischen 71 und 72·5° übergehendes Pyrrol als farbloses Öl, das in Eiskälte erstarrt und bei ZT. wieder flüssig wird, in einer Ausbeute von 4·2 *g* = 28% der Theorie.

Die ätherische Lösung des Pyrrols gibt auf Zusatz von feucht ätherischer Pikrinsäurelösung ein sofort ausfallendes Pikrat, das,

---

[1]) *Liebig*s Ann. d. Chem. **395**. 63 (1913).



aus absolutem Alkohol umkristallisiert, in unregelmäßig gezackten, gelben, prismatischen Blättchen erscheint, die bei 140° schmelzen. Die Analysen erweisen, daß sich das 3.4.5-Trimethylpyrrol gebildet hat:

$$\begin{array}{ccc} H_3C - CO \quad CH_2 - CH_3 & & H_3C - C = C - CH_3 \\ | \qquad\quad | & & \| \qquad \| \\ CH_2 \quad CO - CH_3 & \longrightarrow & HC \quad C - CH_3 \\ \diagdown & & \diagdown \diagup \\ N & & N \\ H_2 & & H \end{array}$$

Das von *Piloty* und *Thannhauser*[1]) durch die Kalischmelze aus Bilirubin entstehende Trimethylpyrrol hat sich mit ihm als identisch erwiesen.

Das isomere 2.3.5-Trimethylpyrrol wird auf folgendem Wege erhalten: 8 *g* Aminobutanonchlorhydrat (das Reduktionsprodukt des Isonitrosomethyläthylketons[2]) werden in 40 cm^3 20%iger Natronlauge gelöst, 3 *g* reines Azeton zugefügt und das Gemisch länger als zwei Monate stehen gelassen. Hiebei vollzieht sich die Kondensation nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{ccc} H_3C - CO \quad CH_3 & & H_3C - C = CH \\ | \;+\; | & & \| \qquad \| \\ H_3C - CH \quad CO - CH_3 & \longrightarrow & H_3C - C \quad C - CH_3 \\ \diagdown & & \diagdown \diagup \\ N & & N \\ H_2 & & H \end{array}$$

doch bildet sich als wesentliches Nebenprodukt aus dem Aminobutanon Tetramethylpyrazin, von dem das Pyrrol nur durch wiederholte fraktionierte Destillation abgetrennt werden kann. Die Ausbeute an Pyrrol (Sp. 16 *mm* = 75·5°, Sp. 754 *mm* = 180 bis 181°) beträgt 2·8 *g* = 50% der theoretisch möglichen Menge.

Mit wässerig.-ätherischer Pikrinsäurelösung entsteht kein kristallisiertes Pikrat. Der mit Hilfe von Diazobenzolsulfonsäure entstehende Azofarbstoff kristallisiert in leuchtend roten, wetzsteinförmigen Gebilden, die meist büschelförmig angeordnet sind (*Hans Fischer*[3]).

Dasselbe Pyrrol wird aus dem Ester der 2.3.5-Trimethyl-4-karbonsäure, der von *Knorr* und *Hess*[4]) aus Isonitrosomethyl-

[1]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **390**. 202 (1912).
[2]) *Diels*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**. 3292 (1902).
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 470 (1912).
[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 2762 (1911).

äthylketon und Azetessigester dargestellt worden ist, durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure durch Verseifung und Abspaltung von Kohlendioxyd gewonnen. Er wird für die Synthese des Phyllopyrrols benützt.

Die Synthese des Hämopyrrols

wurde von *Piloty* und *Blömer*[1]) dadurch erreicht, daß sie durch Kondensation von Aminobutanon und Oxalylazeton zunächst die 2.3-Dimethyl-4-azetylpyrrol-5-karbonsäure darstellten, aus dieser das Karboxyl eliminierten und dann die Azetylgruppe zum Äthyl- reduzierten:

```
H3C — CO    H2C — CO — CH3        H3C — C — C — COCH3
       |  +   |                          ||   ||
H3C — CH    OC — COOR      →      H3C — C    C — COOH    →
        \                                 \  /
         N                                 N
         H2                                H

      H3C — C — C — COCH3              H3C — C — C — C2H5
            ||   ||                          ||   ||
   →  H3C — C    CH               →    H3C — C    CH
             \  /                              \  /
              N                                 N
              H                                 H
```

α) Zu einer Lösung von 9·6 *g* Aminobutanonchlorhydrat in 10 cm^3 Wasser werden allmählich 12·5 *g* Oxalylazeton in schwach alkalischer Lösung gefügt. Und zwar werden diese in Portionen von je 2·5 *g* in Abständen von 24 Stunden eingetragen. Zur Lösung werden dabei je 10 cm^3 10%iger Natronlauge benützt. Das Gemisch bleibt im ganzen fünf Tage bei 40° in einer verschlossenen Flasche stehen. Es beginnt dann bald die Abscheidung einer braun gefärbten Kristallmasse, während die Flüssigkeit dunkelrotbraun wird. Der Niederschlag stellt ein Gemisch der gesuchten Pyrrolkarbonsäure mit Tetramethylpyrazin vor; der größere Teil der ersteren befindet sich als Natriumsalz in Lösung. Zur möglichst vollständigen Abscheidung des Pyrazins läßt man noch zwölf Stunden im Eisschrank stehen, filtriert dann und säuert das Filtrat mit Essigsäure an. Der Filterrückstand wird zur Entfernung der Base mit Wasserdampf destilliert und der hier verbleibende Rückstand zusammen mit der durch Essigsäure bewirkten Fällung aus Alkohol umkristallisiert. Die Karbonsäure erscheint hiebei in nahezu farblosen, prismatischen

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 3749 (1912).

Stäbchen vom Schmelzpunkt 204°. Die Zusammensetzung entspricht der Formel $C_9 H_{11} O_3 N$.

β) Zur Entfernung des Karboxyls wird diese 2.3-Dimethyl-4-azetylpyrrol-5-karbonsäure in Pillen zu zirka 0·5 *g* gedrückt und in einem Kölbchen unter Kohlensäure auf zirka 215° gehalten. Dabei findet die Abspaltung von Kohlendioxyd rasch und gleichmäßig in kurzer Zeit statt, und das zurückbleibende Produkt stellt einen schwach braun gefärbten Sirup vor, der beim Erkalten sofort zu einer blätterig kristallinischen Masse erstarrt. Sie wird durch Essigester gelöst, das Lösungsmittel auf dem Wasserbade rasch verdampft und der Rückstand aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert, wobei das 2.3-Dimethyl-4-azetylpyrrol in farblosen, kurzen, allseitig zugeschärften, prismatischen Täfelchen vom Schmelzpunkt 137° erhalten wird.

γ) 1·7 *g* desselben werden mit 0·65 *g* Hydrazin zunächst so lange im offenen Einschlußrohr im kochenden Wasserbade erhitzt, bis der Röhreninhalt vollständig fest geworden ist. Dann wird eine Lösung von 1·8 *g* Natrium in 25 *cm*³ absolutem Alkohol hinzugefügt, das Rohr geschlossen und acht Stunden auf 160° erhitzt. Der Röhreninhalt wird darauf in Wasser aufgenommen, wobei sich das Hämopyrrol als Öl ausscheidet, während nicht umgesetztes Hydrazon kristallinisch ausfällt, und ersteres mit Wasserdampf übergetrieben. Das Destillat wird schließlich ausgeäthert und die konzentrierte ätherische Lösung mit einer hinreichenden Menge feuchtätherischer Pikrinsäurelösung versetzt, wonach sich sofort die verfilzten feinen, hellgelben Nädelchen des Hämopyrrolpikrats ausscheiden.

Die Synthese des Kryptopyrrols

ist von *Knorr* und *Hess*[1]) durchgeführt worden. Sie gingen von dem 3.5-Dimethyl-4-azetylpyrrol-2-karbonsäureester aus, der sich aus Isonitrosoazetessigester und Azetylazeton bildet (*Zanetti*[2]).

$$
\begin{array}{ccc}
\begin{array}{l}
H_3C - CO \quad CH_2 - CO\,CH_3 \\
\qquad\quad | \;+\; | \\
ROOC - C \qquad CO\,CH_3 \\
\qquad\quad \| \\
\qquad\quad N \\
\qquad\quad OH
\end{array}
& \longrightarrow &
\begin{array}{l}
H_3C - C - C - CO\,CH_3 \\
\qquad\quad \| \quad\; \| \\
ROOC - C - C - CH_3 \\
\qquad\quad \diagdown\,\diagup \\
\qquad\quad\;\; N \\
\qquad\quad\;\; H
\end{array}
\end{array}
$$

Ein eiskalt gehaltenes Gemisch aus 6·5 *g* Azetessigester und 75 *g* 90%iger Essigsäure wird mit der konzentrierten Lösung von

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 2764 (1911).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **26**. 598 Ref. (1893); **27**. 585 und 586 Ref. (1894).

4 *g* Natriumnitrit allmählich versetzt, dann die essigsaure Lösung von 5 *g* Azetylazeton zugegossen und unter stetem Kühlen 25 *g* Zinkstaub eingetragen. Schließlich erwärmt man eine halbe Stunde auf dem Wasserbade und gießt die klare Flüssigkeit in das doppelte Volumen Wasser. Das hiebei ausgefällte Produkt wird aus Weingeist umkristallisiert, wobei es in Nadeln vom Schmelzpunkt 143° erscheint. Zur Verseifung kocht man 5 *g* des Esters mit 12 *g* Kaliumhydroxyd und 200 cm^3 Wasser, fällt die gebildete Säure durch Ansäuern aus und kristallisiert aus Alkohol um. Beim Erhitzen sublimiert sie teilweise, andererseits zersetzt sie sich bei 208 bis 210° unter Abspaltung von Kohlendioxyd, so daß man hiedurch das 3.5-Dimethyl-4-azetylpyrrol, namentlich wenn man im Wasserstoff- oder Stickstoffstrom destilliert, sehr rein erhält. Es kristallisiert aus einem kochenden Gemenge von Essigester und Petroläther in glänzenden Nädelchen vom Schmelzpunkt 139 bis 140°.

Zur Darstellung des Hydrazons erhitzt man 13·7 *g* 3.5-Dimethyl-4-azetylpyrrol mit 5 *g* Hydrazinhydrat acht Stunden lang am Rückflußkühler zum Sieden, worauf die Reaktionsmasse mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung durch Natriumsulfat getrocknet wird. Nach Abdestillation des Äthers verbleibt dann ein sirupöser Rückstand, der nach einigen Tagen zu gelben, rhombischen Kristallen erstarrt. Aus Alkohol umkristallisiert, zeigen diese den Schmelzpunkt 178 bis 179°.

Zur Überführung dieses Hydrazons in das 3.5-Dimethyl-4-äthylpyrrol wurden je 2·5 *g* mit Natriumäthylatlösung (bereitet durch Auflösen von 2 *g* Natrium in 25 cm^3 absolutem Alkohol) zehn Stunden lang auf 150 bis 160° erhitzt. Wegen der Empfindlichkeit des entstehenden Pyrrolderivates gegen Luft wird die Röhre mit Stickstoff gefüllt. Der mit Kristallen durchsetzte Rohrinhalt wird mit ausgekochtem Wasser versetzt und das Pyrrolderivat unter Nachleiten von Wasserstoff mit Wasserdampf abgetrieben. Das Destillat wird mit Ammonsulfat gesättigt und wiederholt mit Äther extrahiert, wonach zur Entfernung des Alkohols die ätherische Lösung einige Male mit konzentrierter Chlorkalziumlösung ausgeschüttelt und dann mit Natriumsulfat scharf getrocknet wird. Bei diesen Operationen wird durch Überleiten von Wasserstoff dafür gesorgt, daß die Lösungen nicht mit Luft in Berührung kommen. Die konzentrierte ätherische Lösung scheidet auf Zusatz feuchtätherischer Pikrinsäurelösung und beim Abkühlen in Eiswasser sofort das Pikrat in derben Kristallen ab, deren Schmelzpunkt bei 131 bis 132° liegt (138 bis 139° nach *H. Fischer* für das reinste Präparat).

Das Ketazin des 3.5-Dimethyl-4-azetylpyrrols erhielten *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*[1]) nach der folgenden Vorschrift:

2 *g* des Pyrrolderivates werden mit 0·8 *g* Hydrazinhydrat und 1 cm^3 absolutem Alkohol fünf Stunden lang unter Rückfluß im siedenden Wasserbade erhitzt. Alsdann verdünnt man mit ungefähr dem gleichen Volumen heißen Alkohols und filtriert. Zu dem Filtrat setzt man Essigsäure bis zur eben noch alkalischen Reaktion auf Lackmus und gibt dann unter gelindem Erwärmen Wasser bis zur beginnenden Trübung hinzu. Bei längerem Stehen scheidet sich dann das Ketazin in nadelförmigen Prismen ab (Ausbeute 1·3 *g*). Der Schmelzpunkt der aus 50%igem Alkohol mehrmals umkristallisierten Substanz schwankt zwischen 195 bis 215°.

Das Ketazin ist in Äther und Ligroin schwer löslich, in Benzol ziemlich schwer, in Alkohol und Chloroform leicht und in Eisessig sehr leicht löslich; letztere Lösung ist intensiv gelb gefärbt, was auf Salzbildung beruhen dürfte, denn in verdünnter Schwefelsäure (1: 3) löst sich das farblose Ketazin ebenfalls mit gelber Farbe. Versetzt man die alkoholische Lösung des Ketazins mit einer ätherischen Lösung von Pikrinsäure, so scheidet sich sehr schnell ein rötlichgelbes Pikrat ab, das bei 208 bis 210° schmilzt. Die Reaktion des Ketazins mit Dimethylaminobenzaldehyd ist stark positiv.

Das Ketazin wird nun nach dem Verfahren von *Knorr* und *Hess* nur in unbedeutender Menge reduziert, liefert aber beim Erhitzen auf höhere Temperatur (200 bis 220°) in guter Ausbeute ein öliges Pyrrol, dessen Siedepunkt zwar dem des Kryptopyrrols entspricht, das sich aber als ein Gemisch erwiesen hat. Und zwar setzt es sich aus dem tetrasubstituierten 3.5-Dimethyl-2.4-Diäthylpyrrol und dem 3.5-Dimethyl-2-äthylpyrrol zusammen. Bei der hohen Temperatur wird also der in β-Stellung befindliche Ketazinrest abgesprengt, zugleich aber erfolgt eine Äthylierung in α-Stellung bezw. in Stellung *2* und *4*, und damit war der Nachweis erbracht, daß durch Alkylate unter den angegebenen Bedingungen eine Alkylierung der Pyrrole bewirkt werden kann, was dann bei den Synthesen des Phyllopyrrols und als — indirekter — Konstitutionsbeweis für das Hämopyrrol benützt worden ist.

Der Beweis für die soeben erwähnte Zusammensetzung des Gemisches ergab sich aber daraus, daß einmal die ätherische Lösung mit Pikrinsäure ein leicht zersetzliches Pikrat gibt, das zunächst den unscharfen Schmelzpunkt 82 bis 83° zeigt, der mit dem des

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 3315 (1911).



rohen Pikrates des tetrasubstituierten Pyrrols übereinstimmt; im reinen Zustande schmilzt es bei 89 bis 90° [1]). Andererseits konnte das trisubstituierte Pyrrol als Azofarbstoff abgeschieden werden, der als zur β-Reihe gehörig charakterisiert wurde.

1 *g* Diazobenzolsulfonsäure wird in zirka 100 *cm*³ Wasser gelöst und hiezu eine gleiche Menge des öligen Pyrrols, in Alkohol gelöst, gegeben. Sofort entsteht eine tiefrote Färbung, und nach Versetzen mit wenig verdünnter Salzsäure und heftigem Schütteln kristallisiert der Farbstoff in schönen, konzentrisch angeordneten, leuchtend roten Nadeln aus. Nach halbstündigem Stehen wird abgesaugt und chlorfrei gewaschen. Zur Reinigung wird er in n/10-Natronlauge gelöst, wobei ein Umschlag der Farbe in Gelb stattfindet, und durch n/10-Salzsäure wieder gefällt. Das synthetisch hergestellte 3.5-Dimethyl-2-äthylpyrrol gab denselben Azofarbstoff und ging durch Behandeln mit Natriumäthylat in das 3.5-Dimethyl-2.4-äthylpyrrol über[2]).

Ein isomeres Pyrrol, und zwar das 2.3-Dimethyl-5-äthylpyrrol, gewannen dann *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*[3]) durch Kondensation des Isonitrosomethyläthylketons mit Dipropionylmethan nach der Methode von *Knorr* zum 2.3-Dimethyl-4-propionyl-5-äthylpyrrol und Absprengung des Propionylrestes durch mäßig konzentrierte Schwefelsäure.

$$\begin{array}{l} H_3C - CO \\ \qquad\quad | \\ H_3C - C = NOH \end{array} + \begin{array}{l} CH_2 - COC_2H_5 \\ | \\ CO - C_2H_5 \end{array} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \begin{array}{c} H_3C - C - C - COC_2H_5 \\ \quad\; \| \quad\;\; \| \\ H_3C - C \quad C - C_2H_5 \\ \diagdown\;\diagup \\ N \\ H \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} H_3C - C - CH \\ \quad\; \| \quad\; \| \\ H_3C - C \quad C . C_2H_5 \\ \diagdown\;\diagup \\ N \\ H \end{array}$$

Aus letzterem konnte dann durch Äthylierung in Stellung 4 dasselbe tetrasubstituierte Pyrrol erhalten werden, das durch Einführung eines Äthyls in das Hämopyrrol hervorging, wodurch die Konstitution des Hämopyrrols indirekt bewiesen war:

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **77.** 193 (1912).

[2]) *H. Fischer* und *E. Bartholomäus*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **77.** 194 (1912).

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45.** 1979 (1912).

$$\begin{array}{c} H_3C-C=CH \\ H_3C-C=C-C_2H_5 \\ \diagdown\diagup \\ NH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} H_3C-C=C-C_2H_5 \\ H_3C-C=C-C_2H_5 \\ \diagdown\diagup \\ NH \end{array} \longleftarrow$$

$$\longleftarrow \begin{array}{c} H_3C-C=C-C_2H_5 \\ H_3C-C=CH \\ \diagdown\diagup \\ NH \end{array}$$

Die Synthese des Phyllopyrrols

ist, von verschiedenen Pyrrolen ausgehend, mehrfach durchgeführt worden; dabei handelte es sich um eine totale Synthese oder, insofern das als Spaltstück des Hämins erhaltene Hämopyrrol bezw. das Kryptopyrrol benützt wurde, um eine partielle Synthese. Die erstere wurde durch Äthylierung des 2.3.5-Trimethylpyrrols (vgl. S. 289) oder durch Ersatz des Azetyls im 2.3.5-Trimethyl-4-azetylpyrrol über das Hydrazon bezw. das Ketazin durch Äthyl ausgeführt (*H. Fischer* und *E. Bartholomäus*[1]), *U. Colacicchi*[2]).

A. Aus Hämopyrrol oder Kryptopyrrol.

4·5 *g* des Pyrrolpikrates werden mittels Natronlauge in das freie Pyrrol verwandelt, das letztere wird dann in zwei Röhren mit einer Lösung von je 1·4 *g* Natrium in 20 cm^3 Methylalkohol zehn bis zwölf Stunden lang auf 210 bis 220° erhitzt, wonach das Reaktionsprodukt sodaalkalisch mit Wasserdampf überdestilliert wird. Das Phyllopyrrol erstarrt hiebei in der Vorlage, so daß es abgesaugt werden kann. Man kristallisiert es um, indem man in Alkohol löst und die Lösung mit Wasser versetzt. Die Ausbeute beträgt 1 *g*.

B. Aus 2.3.5-Trimethylpyrrol.

1 cm^3 des Pyrrols wird mit einer Lösung von 1·4 *g* Natrium in 20 cm^3 absolutem Äthylalkohol zehn bis zwölf Stunden im Bombenrohr auf 210 bis 220° erhitzt, worauf sodaalkalisch mit Wasserdämpfen abgetrieben wird. Gibt das Destillat noch die *Ehrlich*sche

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 468 (1912); Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**. 198.

[2]) *Atti R.* Acc. dei Lincei Roma. (5.) **21**. I. 489.

Aldehydreaktion, so wird ausgeäthert und der ätherische Auszug mit Diazobenzolsulfonsäure bis zum Verschwinden jener Reaktion ausgekuppelt, wonach das Phyllopyrrol nach Entfernung des Äthers von neuem sodaalkalisch mit Wasserdämpfen übergetrieben und das Destillat zweimal ausgeäthert wird. In die ätherische Lösung wird dann feste Pikrinsäure eingetragen, worauf das Phyllopyrrolpikrat auskristallisiert. Die Ausbeute ist mangelhaft.

C. Aus 2.3.5-Trimethyl-4-acetylpyrrol $C_9H_{13}ON$. Schmelzpunkt 209°.

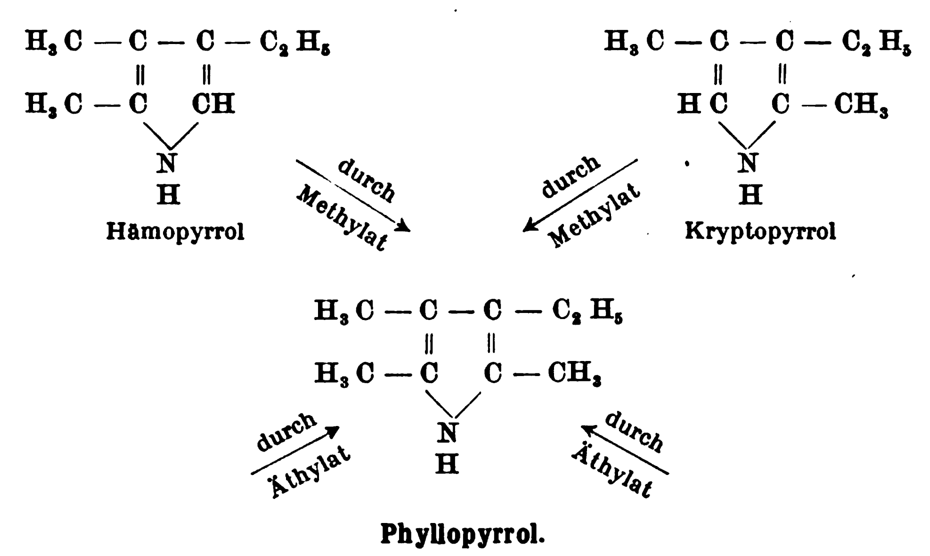
a) 1 *g* Isonitrosomethyläthylketon und 1 *g* Azetylazeton werden in 20 *cm*³ Eisessig gelöst. Zu der Lösung gibt man allmählich unter Kühlung 6·5 *g* Zinkstaub und erwärmt schließlich unter öfterem Umschütteln eine viertel Stunde lang auf dem Wasserbade, kocht dann kurz auf und saugt vom Zinkstaub ab. Durch Verdünnen mit Wasser wird aus dem Filtrat das Pyrrolderivat gefällt. Die Ausbeute beträgt bis 43% der theoretisch möglichen Menge. Zur Reinigung wird aus heißem Alkohol umkristallisiert, in Äther und Azeton ist die luft- und lichtbeständige Substanz schwer löslich.

$$\begin{array}{l} H_3C-CO \\ \quad\;\;| \\ H_3C-C=NOH \end{array} + \begin{array}{l} CH_2-CO-CH_3 \\ | \\ CO-CH_3 \end{array} = \begin{array}{c} H_3C-C-C-COCH_3 \\ \quad\;\; \| \quad\; \| \\ H_3C-C \quad C-CH_3 \\ \diagdown\;\diagup \\ N \\ H \end{array}$$

b) 5 *g* 2.3.5-Trimethyl-4-azetylpyrrol, 1 *cm*³ Alkohol, 5 *cm*³ Hydrazinhydrat und 1 *cm*³ 3%ige Essigsäure werden zusammen unter Rückfluß acht Stunden lang auf 140 bis 150° erhitzt. Alsdann verdünnt man mit Wasser, filtriert und säuert mit Essigsäure an. Es erfolgt sofort Abscheidung eines gelben Harzes, das über Nacht fest wird und dann beim Trocknen auf dem Wasserbade die gelbe Farbe fast vollständig verliert. Das so erhaltene gelblichweiße Rohprodukt schmilzt unscharf bei 219 bis 220°, da ein Gemisch von Ketazin und Hydrazon vorliegt, das sich aus Alkohol umkristallisieren läßt. Die Ausbeute beträgt 4·1 *g*.

c) 2 *g* dieses Gemisches werden mit 35 *cm*³ einer Lösung von 7 *g* Natrium in 100 *cm*³ absoluten Alkohols in einem Bombenrohr acht Stunden lang auf 210 bis 220° erhitzt. Das Reaktionsprodukt stellt ein Gemisch vor, von dem ein Teil mit Wasserdämpfen schwer flüchtig ist. Hier scheint ein am Stickstoff substituiertes Pyrrol mit einer freien Methingruppe vorzuliegen, da die Aldehydreaktion positiv, die mit Diazobenzolsulfonsäure dagegen negativ ist. Der

mit Wasserdämpfen leicht flüchtige Teil stellt ein gelbes Öl vor, das beim Stehen in Eis allmählich erstarrt. Zur Abtrennung trisubstituierter Pyrrole wird dieses rohe Phyllopyrrol in Äther überführt und die ätherische Lösung mit Diazobenzolsulfonsäure im Überschuß ausgekuppelt, worauf der Äther abdestilliert und der Rückstand sodaalkalisch von neuem mit Wasserdämpfen destilliert wird, wobei nun das Phyllopyrrol fast rein übergeht, so daß es im Destillat erstarrt. Die folgende Übersicht stellt die verwirklichten Synthesen des Phyllopyrrols in Formelbildern dar:



$$\begin{array}{l} H_3C - C - CH \\ \qquad \| \quad \| \\ H_3C - C \quad C - CH_3 \\ \qquad \diagdown \diagup \\ \qquad\ \ N \\ \qquad\ \ H \end{array}$$

2.3.5 Trimethylpyrrol

$$\begin{array}{l} H_3C - C - C - COCH_3 \\ \qquad \| \quad \| \\ H_3C - C \quad C - CH_3 \\ \qquad \diagdown \diagup \\ \qquad\ \ N \\ \qquad\ \ H \end{array}$$

2.3.5 Trimethyl-4-acetylpyrrol

* * *

Das 3-Methyl-4-Äthylpyrrol ist von *Marchlewski* und *Grabowski*[1]) durch Destillation des Methyläthylmaleinimides mit Zinkstaub in geringen Mengen erhalten worden.

* * *

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**. 88 bis 89 (1912); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 2159 (1914).

Im Anschluß an die Synthese des Phyllopyrrols sei noch die des

Tetramethylpyrrols

erwähnt, weil sie von *H. Fischer*, *E. Bartholomäus* und *H. Röse* im größeren Maßstabe durchgeführt worden ist, wobei ein eiserner Autoklav von zirka 1 *l* Inhalt benützt wurde[1]).

50 *g* Kalium werden in 200 *g* Methylalkohol gelöst und die Lösung nach Zugabe von 29 *g* 2.3.5-Trimethylpyrrol fünf Stunden lang auf 220 bis 225° erhitzt, wobei der Druck nicht über 33 Atmosphären steigt; auch ist nach dem Erhalten nur noch wenig Druck vorhanden. Das Reaktionsprodukt wird dann sodaalkalisch mit Wasserdämpfen abgetrieben und das im Destillat erstarrende Pyrrolderivat abgesaugt. Man erhält es in einer Ausbeute von 29 *g* und reinigt es über das Pikrat, zu dessen Darstellung 5 *g* Pikrinsäure in wenig feuchtem Äther gelöst und mit einer konzentriert ätherischen Lösung von 5 *g* des Pyrrols versetzt werden. Nach schnell vorübergehender Dunkelfärbung tritt unter gleichzeitiger Aufhellung der Farbe nahezu quantitative Abscheidung des schön kristallisierenden Pikrates in einer Ausbeute von 9·7 *g* ein. Aus diesem kann das Pyrrol leicht regeneriert werden; dazu überschichtet man 5 *g* desselben mit zirka 200 cm^3 Äther und schüttelt mit 20 cm^3 25%iger Salzsäure; die ätherische Lösung wird dann noch zweimal mit 8 bis 10 cm^3 der Säure ausgeschüttelt. Die vereinigten sauren Extrakte werden dann zweimal zur vollständigen Entfernung der Pikrinsäure mit Äther behandelt, worauf sie mit Soda alkalisch gemacht werden, damit das Tetramethylpyrrol nunmehr wieder mit Wasserdampf übergetrieben werden kann. Man saugt es ab, löst in heißem Alkohol und versetzt die Lösung mit Wasser bis zur beginnenden Trübung, wonach es beim Erkalten in farblosen Täfelchen auskristallisiert. Es schmilzt bei 111 bis 112°, löst sich in verdünnten Säuren und ist sehr empfindlich gegen Licht und Luft; mit dem Reagens von *Ehrlich* tritt keine Färbung ein.

Die Aufspaltung des Hämins und der Porphyrine durch Kaliumalkoholat

tritt bei hoher Temperatur ein und zugleich entwickelt sich bei diesem Vorgange ein sehr hoher Druck, wahrscheinlich von abgespaltenem Wasserstoff herrührend. Die sich abspielenden Prozesse sind überhaupt recht verwickelter Art; zunächst tritt neben der Aufspaltung, die unter anderen Pyrrole liefert, also durch Anlagerung von Wasserstoff bedingt sein muß, Alkylierung ein, so daß bei Verwendung von Methylat nicht das Gemisch von Hämo-,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 12 (1912); **87**. 45 (1913).

Krypto- und Phyllopyrrol entsteht, wie bei der reduktiven Aufspaltung durch Eisessig-Jodwasserstoff, sondern nur Phyllopyrrol. Aus demselben Grunde bilden sich nicht die Phonopyrrolkarbonsäuren, sondern nur die Trimethylpyrrol-4-propionsäure als saures Spaltungsprodukt. Kaliummethylat wirkt aber bei hoher Temperatur nicht nur reduzierend ein, sondern es kann auch geeignete Substrate oxydieren, und zwar scheint diese Reaktion hauptsächlich dann einzutreten, wenn es sich nicht um die Porphyrine, sondern um ihre Reduktionsprodukte handelt, also z. B. um Mesoporphyrinogen. Ganz analog wird die Bilirubinsäure in die Xanthobilirubinsäure übergeführt (vgl. S. 348). Kaliumäthylat wirkt dagegen, unter denselben Bedingungen wie das Methylat verwandt, auf das Substrat nur reduzierend ein, indem die korrespondierende Oxydation sich auf das Äthylat selbst erstreckt, andererseits ist gerade hier eine starke Entwicklung von Wasserstoff beobachtet worden, also sehr hoher Druck.

Die Ausführung der Aufspaltung des Hämins gestaltet sich wie folgt[1]):

50 *g* Kalium werden in 200 *g* absoluten Methylalkohol gelöst und in einem eisernen Autoklaven von zirka 1 *l* Inhalt eingefüllt; in diese Lösung trägt man 25 *g* feingepulvertes Hämin ein, rührt durch und verschließt den Autoklaven. Die Temperatur wird sowohl im Innern desselben als auch in dem zur Heizung dienenden Ölbad gemessen. Hat letzteres eine Temperatur von 280° erreicht, so ist die Temperatur im Innern auf 180° bei 18 Atmospären Druck gestiegen; etwa zwei Stunden danach beträgt sie 250° und hält sich auf dieser Höhe viereinhalb Stunden lang, während der Druck von 74 auf 103 Atmosphären steigt und die Ölbadtemperatur etwa 300° erreicht hat. Die Hauptreaktion liegt zwischen 220 bis 230°, und es genügt daher auch, das Ölbad bei etwa 275° zu halten, wobei allmählich ein Druck von 54 Atmosphären und die angegebene Temperatur im Innern entsteht, und drei Stunden bei dieser zu erhalten, wenigstens sind die Ausbeuten an Phyllopyrrol nicht geringer, während die an dem sauren Spaltprodukt bei längerem Erhitzen und höherer Temperatur etwas besser werden.

Nach dem Erkalten sind am nächsten Tage dann noch 27 Atmosphären Druck vorhanden. Der hellgelblich gefärbte Autoklaveninhalt wird dann ausgeschöpft und mit Wasserdämpfen destilliert, wobei 8 *g* nicht ganz reines Phyllopyrrol erhalten werden. Der nicht flüchtige Rückstand wird vom Eisenhydroxyd abfiltriert und noch alkalisch ausgeäthert, wobei eine Substanz extrahiert wird, die nach der Reduktion mit Eisessigjodwasserstoff noch Phyllopyrrol gibt. Dann wird angesäuert und wieder erschöpfend ausgeäthert.

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 38 (1913).

Nach Abdampfen des Äthers hinterbleibt ein stark nach Fettsäuren riechender Sirup, aus dem sich diese Säuren durch Destillation im Vakuum aus dem siedenden Wasserbade entfernen lassen, wonach der 7·1 *g* wiegende, zurückbleibende Sirup zweimal mit siedendem Wasser ausgezogen wird. Die wässerige Lösung wird dann nach dem Erkalten filtriert und das Filtrat dreimal mit Äther extrahiert. Nach Abdestillation des Äthers im Vakuum wird schließlich der Rückstand mit 45 cm^3 10%iger, feuchtätherischer Pikrinsäurelösung übergossen; er geht dabei schnell unter Dunkelfärbung in Lösung, und nach zweistündigem Stehen im Eis scheidet sich ein rotes Pikrat im Gewicht von 3·8 *g* ab. Durch Umkristallisieren aus Alkohol wird es gereinigt (Ausbeute 1·6 *g*) und zeigt dann den Schmelzpunkt 125 bis 126° des Pikrates der Trimethylpyrrol-4-propionsäure (vgl. S. 282).

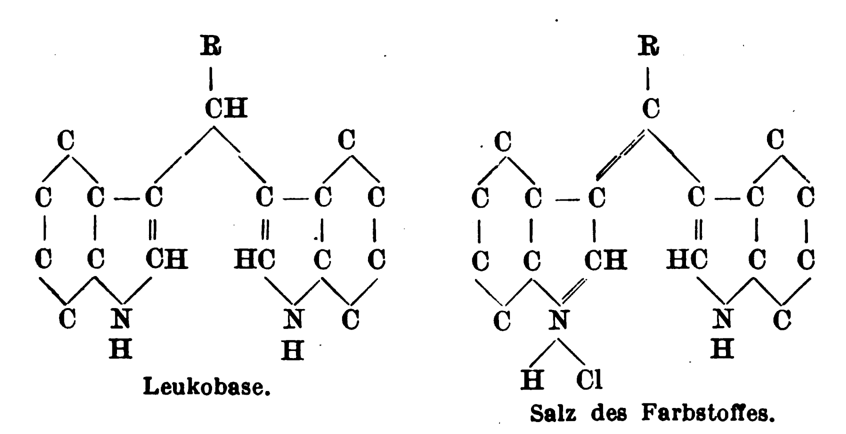
Nachtrag:

Zu S. 287: Darstellung des 2.4-Dimethylpyrrol-3.5-Dikarbonsäureesters: *L. Knorr* und *K. Hess* (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 2629 [1912]) verfahren wie folgt: Zehntelmole Isonitrosoazetessigester und Azetessigester werden in 150 cm^3 Alkohol gelöst und der Lösung 500 *g* fein zerstoßenes 2·5%iges Natriumamalgam in kleinen Portionen unter Turbinieren und Einleiten von Kohlensäure zugefügt. Temperatur 60°. Dauer eine Stunde. Aus der Reaktionsmasse Natriumsalze und Quecksilber abgetrennt. Lösung im Vakuum bei 40° bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, dann 250 cm^3 Wasser zugesetzt. Produkt scheidet sich in einer Ausbeute von 70% der Theorie in dicken Flocken ab.

Synthesen mehrkerniger Pyrrolderivate und die Konstitution des Hämins.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Die folgenden Arbeiten beziehen sich auf Untersuchungen, die über die Konstitution des Hämins als Farbstoff Aufklärung zu schaffen bezweckten. *W. Küster*[1]) hatte bei dem Versuch, ein Formelbild für das Hämin zu entwerfen, die Konstitution der von *E. Fischer*[2]) sowie von *Freund* und *Lebach*[3]) hergestellten Farbstoffe als Vorbild genommen, die durch Kondensation von Indolen mit Aldehyden entstehen und als Indylindolenylmethanderivate erkannt worden waren. Zu analog konstituierten Stoffen war *Friedländer*[4]) durch Vereinigung zweier Molekülen von Oxyindolaldehyden unter Absprengung von Ameisensäure gelangt.



Leukobase. Salz des Farbstoffes.

Ferner war auf die von *Feisst*[5]) durch Kondensation von Aldehyden mit Pyrrolderivaten erhaltenen Stoffe hingewiesen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 468 (1912).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **20**. 815 (1887); *Liebigs* Ann. **242**. 372 (1887).

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**. 2640 (1905);

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**. 3098 (1911).

[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**. 1647 (1902).

worden, die durch Oxydation ebenfalls in Farbstoffe übergehen (*H. Fischer* und *F. Meyer-Betz*[1]). Beim Hämin mußte nun der Eingriff des Aldehydes in die α-Stellung der Pyrrolkerne erfolgt sein, da ja sämtliche Spaltprodukte sich in β β'-Stellung als bereits substituiert erwiesen hatten.

H. Fischer[2]) erbrachte nun für diese Ansicht eine erste experimentelle Unterlage dadurch, daß er bei Dipyrrylmethanderivaten, bei denen die Verknüpfung sicher in α-Stellung erfolgt sein mußte, ein ähnliches Verhalten gegenüber Eisessigjodwasserstoff sowohl wie gegenüber Kaliummethylat nachwies, wie es beim Hämin beobachtet worden war, während Pyrrolderivate, bei denen die Verbindung mit dem Methanrest in β-Stellung vorgenommen worden war, ein abweichendes Verhalten aufwiesen. So zerfiel das von *Colacicchi*[3]) dargestellte Bis(2.4-dimethyl-3-azetylpyrryl)methan (I) unter den bei der Reduktion des Blutfarbstoffes üblichen Bedingungen durch Eisessigjodwasserstoff, während eine Spaltung des isomeren Bis(2.4-dimethyl-5-azetylpyrrol)methans (II) nicht eintrat, sondern nur eine Abspaltung der Azetylgruppen bewirkt wurde. Erst durch zwölfstündiges Kochen mit dem Reduktionsgemisch wurde die Aufspaltung erreicht.

```
                              CH2
                            /     \
                          /    I    \
   H3C — C = C<             >C = C — CH3
          |      >NH      N<      |
H3C — CO — C = C<             >C = C — CO — CH3
                 \CH3  H3C/

                            CH2
                           /   \
      H3C\                /     \              /CH3
          >C = C/                 \C = C<
    NH<         |        II        |       >NH
          >C = C                   C = C<
H3C — CO/          \              /       \CO — CH3
                   CH3          CH3
```

Eine zweite Versuchsreihe bezieht sich auf die Verkettung von Pyrrolderivaten mit dem Formaldehyd, welcher nach der em-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**. 253 (1911).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 2019 (1914); Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**. 50; **87**. 255 (1913).

[3]) *Atti R.* Accad. dei Lincei Roma. (5.) **20**. II. 312; Chem. Zentralbl. **1912**. I. 143.

pirischen Zusammensetzung der Porphyrine und der ihrer Spaltprodukte in Betracht kommen mußte, wenn das Bild *W. Küsters* die Konstitution des Hämins einigermaßen richtig veranschaulichte. Daneben konnte aber auch an das Glyoxal gedacht werden, und das von *R. Willstätter*[1]) entworfene Bild entsprach dieser Vorstellung, welche namentlich dadurch Berechtigung erhalten hatte, daß eine in α-Stellung äthylierte Pyrrolkarbonsäure unter den Spaltprodukten des Hämins vorhanden sein sollte (vgl. S. 283). In der Tat hätte eine Säure

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\qquad\quad H_3C - C = C - H \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad \Big| \qquad \rangle NH \\ COOH - CH_2 - CH_2 - C = C - CH_2 - CH_3, \end{array}$$

die durch reduktiven Eingriff aus dem Hämin hervorging, darauf hingewiesen, daß die Gruppe

$$>C = C<$$

zur Verknüpfung der Pyrrolkerne im Hämin Verwendung gefunden habe. Merkwürdigerweise verlief die Synthese mehrkerniger Pyrrolderivate mit Hilfe von Glyoxal bei einigen Versuchen insofern anormal, als sich dieselben Farbstoffe wie mit Formaldehyd bildeten.

Zu einer Synthese von Stoffen, die mit den Porphyrinen Ähnlichkeit haben, ist man bisher noch nicht gelangt.

Kondensation von Pyrrolderivaten mit Aldehyden (Methode von Fr. Feisst).

Ein Gemenge von zwei Molekülen des Pyrrolderivates (z. B. 1 *g* 2.4-Dimethylpyrrol-3-karbonsäureester) mit einem Molekül des Aldehydes (z. B. 0·63 *g* Benzaldehyd) wird im Ölbade zum Schmelzen gebracht und dann unter Zusatz von wenig gepulvertem Kaliumbisulfat bis auf die Temperatur (bei den verzeichneten Stoffen 90 bis 100°) gebracht, bei welcher Wasserabspaltung flott vonstatten geht[2]). Der überschüssige Aldehyd wird dann durch Wasserdampfdestillation entfernt, das Kondensationsprodukt in alkoholischer Lösung mit Tierkohle gekocht, filtriert und das Filtrat vorsichtig mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Die hier entstehende Abscheidung muß dann noch zur Entfernung von reichlich gebildetem Farbstoff aus verdünntem Alkohol umkristallisiert werden.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 434 (1913).

[2]) Dimethylpyrrol kondensiert sich schon bei Zimmertemperatur mit Aldehyden unter starker Farbstoffbildung, so daß die erhaltenen Produkte schwer zu isolieren sind.

Das Bis(2.4-dimethylpyrrol-3-karbonsäureester)phenylmethan $C_{25} H_{30} O_4 N$

$$
\begin{array}{c}
H_5C_6 - CH \\
H_3C - C = C \quad\quad C = C - CH_3 \\
\quad\quad | \quad\quad > NH \quad HN < \quad\quad | \\
H_5C_2OOC - C = C \quad\quad C = C - COOC_2H_5 \\
\quad\quad CH_3 \quad H_3C
\end{array}
$$

ist in Alkohol und Azeton leicht, in Äther schwer löslich, in Ligroin und Wasser unlöslich und schmilzt bei 188°. Durch Oxydation geht dieser farblose Stoff in eine gefärbte Substanz über, und analog gebaute Condensationsprodukte aus Pyrrolderivaten mit Aldehyden verhalten sich ebenso.

Da die Kondensation mit Hilfe von Kaliumbisulfat in manchen Fällen ein unsicheres Resultat und schlechte Ausbeuten ergibt, sei eine zweite, von *H. Fischer* und *Fr. Meyer-Betz*[1]) ausgearbeitete Methode angeführt.

Kondensation des 2.5-Dimethylpyrrol-3-karbonsäureesters mit p-Dimethylaminobenzaldehyd.

2 *g* des Esters werden mit 4 *g* des Aldehydes in 30 cm^3 Alkohol am Rückflußkühler gelöst und 1 cm^3 Schwefelsäure schnell eingetragen, wobei sich die Lösung sofort rot färbt. Sie wird noch heiß in 200 cm^3 Wasser gegossen, worauf nach einigen Minuten die größte Menge des nicht in Reaktion getretenen Aldehydes auskristallisiert Von diesem wird abgesaugt und das Filtrat mit so viel Natronlauge versetzt, daß Kongopapier saure Reaktion nicht mehr anzeigt, wohl aber Lackmus. Hiebei entsteht ein rötlicher Niederschlag, der aus dem Kondensationsprodukt und wenig Aldehyd besteht. Von diesem wird wieder abgesaugt und das Filtrat alkalisch gemacht, wodurch fast reines Kondensationsprodukt zur Abscheidung gelangt. Aus Alkohol mehrmals umkristallisiert, erscheint es in Form farbloser Kristalle vom Schmelzpunkt 239°, die gegen den Luftsauerstoff sehr empfindlich sind, so daß bald Rotfärbung eintritt. Es ist mäßig leicht in Alkohol, sehr schwer in Wasser, nur wenig in Äther, in Benzol und Petroläther schwer löslich. Die Zusammensetzung entspricht der Formel $C_{27} H_{35} O_4 N_3$.

Auch dieser Stoff läßt sich leicht zu einen Farbstoff oxydieren. Die Lösung von 0·1 *g* der Leukobase in 5 cm^3 Alkohol wird mit 3 cm^3

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**. 256 (1911).



10%iger Eisenchloridlösung versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt, wobei sofort intensive Dunkelblaurotfärbung eintritt. Der entstandene Farbstoff läßt sich der mit Wasser verdünnten Lösung durch Chloroform entziehen, nach Abdestillation des Chloroforms und Trocknen des Rückstandes erscheint letzterer als harter, dunkelroter, im auffallenden Licht grün schimmernder, metallisch glänzender Farbstoff, der sehr leicht in Alkohol, Chloroform und auch in Wasser löslich ist. Er besitzt intensive Färbekraft und gibt noch in einer Verdünnung von 1:100.000 bei 15 *mm* Schichtdicke eine bei 608 bis 556 $\mu\mu$ liegende Absorption im Spektrum. Der Farbton und die Intensität der Färbung sowie das Umschlagen der Farbe durch Alkalien, endlich die Reduzierbarkeit zur Farblosigkeit durch Zinkstaub und die Wiederoxydation schon an der Luft entspricht dem Fuchsin und seinem Verhalten. Es kann daher angenommen werden, daß auch die Konstitution des Farbstoffes der des Fuchsins analog ist, wozu noch zu bemerken ist, daß die beiden Pyrrolkerne mit ihrem dem Phenol ähnlichen Charakter eine Mittelstellung des neuen Farbstoffes zwischen der Rosolsäure und dem Rosanilin bedingen.

* * *

Als Repräsentant einer Klasse, die in den Pyrrolkernen ungleiche Substituenten trägt und in dieser Hinsicht der Bilirubinsäure (vgl. S. 345) vergleichbar ist, wurde von *H. Fischer* und *E. Bartholomäus* das 2.4.2'.4'-Tetramethyl-3-azetyl-3'-karbäthoxydipyrrylmethan synthetisiert.

```
                              C
                           /  H2  \
        H3C — C = C<                 >C = C — CH3
              |      >NH      HN<        |
 H3C — OC — C = C<                 >C = C — COOC2H5
                     \CH3     H3C/
```

Zu einer Lösung von 8·5 *g* 2.4-Dimethyl-3-azetylpyrrol und 10·5 *g* 2.4-Dimethylpyrrol-3-karbonsäureester in 50 cm^3 Alkohol setzt man 5 cm^3 einer 40%igen Formaldehydlösung und 5 cm^3 konzentrierte Salzsäure und erhitzt bis zum Beginn der ziemlich heftigen Reaktion. Beim Abkühlen kristallisiert das Kondensationsprodukt aus (9·1 *g*). Es bildet ein rötlichgelbes Kristallpulver, das durch Aufnehmen in Alkohol und vorsichtigen Zusatz von Wasser in gelblichen, prismatischen Kristallen erhalten wird, die scheinbar dem rhombischen System angehören. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 231 bis 232°. In Alkohol und Chloroform ist die Substanz schwer,

in Essigester und Azeton sehr schwer löslich. In heißem Eisessig löst sie sich leicht, beim längeren Kochen nimmt die Lösung eine intensiv grüne Farbe an. Die Aldehydreaktion ist bei ZT. schwach positiv, beim Kochen wird sie sehr stark.

Ebenso gut gelingt die Kondensation mit Azetaldehyd, also z. B. die Synthese des

Bis(2.4-dimethyl-3-azetylpyrryl)methylmethans,

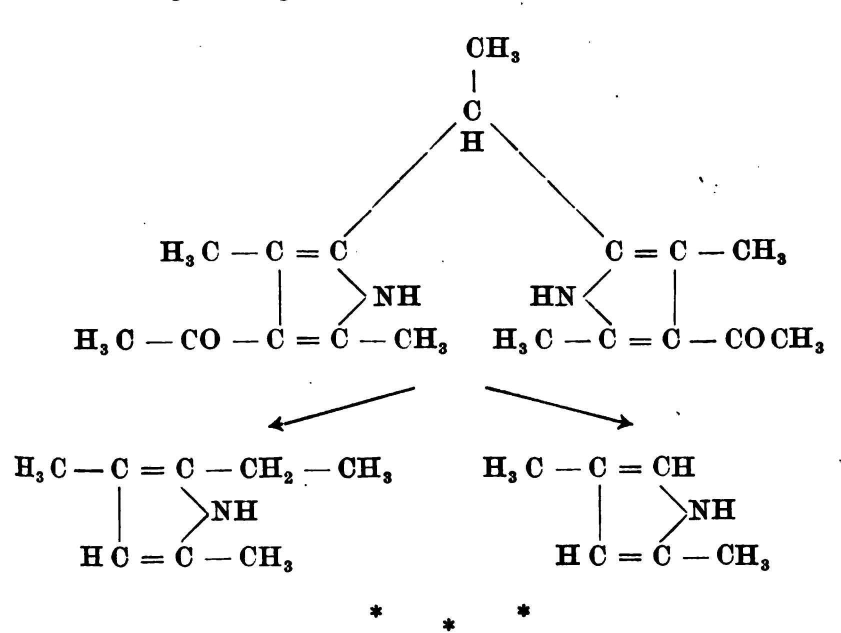
mit welchem Stoff dann die Aufspaltung durch Eisessigjodwasserstoff durchgeführt wurde.

Eine Lösung von 10·7 *g* 2.4-Dimethyl-3-azetylpyrrol und 7 cm^3 Azetaldehydlösung von 40 Gewichtsprozenten in 40 cm^3 Alkohol und 1 cm^3 konzentrierter Salzsäure wird bis zum Beginn der Reaktion erhitzt. Schon während des Kochens beginnt die Kristallisation des Kondensationsproduktes, die dann durch Stehen in Eis vervollständigt wird. Das in einer Ausbeute von 8·6 *g* erhaltene Rohprodukt wird aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, wobei die Substanz in farblosen, rechtwinkelig begrenzten Täfelchen vom Schmelzpunkt 251 bis 252° erhalten wird. Sie ist in Alkohol, Azeton und Essigester schwer, in warmem Eisessig und Azetylentetrachlorid leicht löslich. Die Eisessiglösung wird beim Kochen amethystfarben, spektroskopisch ist ein Streifen im Gelb zu sehen. Setzt man zu einer Eisessiglösung bei ZT. ein Körnchen Natriumnitrit, so nimmt die Flüssigkeit eine intensiv rote Farbe an, die nach einiger Zeit wieder verschwindet; im Spektrum ist ein breiter Streifen im Grün zu sehen. Eine Lösung in konzentrierter Schwefelsäure zeigt diese Färbung bei Zusatz von Nitrit nicht. Die Aldehydreaktion tritt zunächst nicht ein, aber allmählich rötet sich die Lösung und das Spektrum zeigt einen breiten Streifen im Grün. Beim Kochen wird die Färbung stärker und sehr bald erfolgt ein Farbenumschlag nach Blauviolett. Beim Verdünnen mit Alkohol wird die Lösung rein blau; im Spektrum zeigen sich jetzt zwei Streifen im Grün und Rot.

Zur reduktiven Aufspaltung werden 4 *g* der Substanz mit 120 cm^3 eines Eisessigjodwasserstoffgemisches (2 : 1) zwei Stunden lang im siedenden Wasserbade erhitzt, alsdann mittels Phosphoniumjodides entfärbt und die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand ist in sodaalkalischer Suspension bei der Destillation mit Wasserdampf fast vollständig flüchtig, also ist vollständige Aufspaltung erfolgt. Das flüchtige Öl besteht aus 2.4-Dimethyl- und 2.4-Dimethyl-5-äthylpyrrol. Zur Trennung wird das Vermögen dialkylsubstituierter Pyrrole mit Diazobenzolsulfonsäure rascher zu kuppeln als trisubstituierte benützt.

Die ätherische Lösung des Öles wird also zuerst mit einer mit Salzsäure versetzten Lösung von 1 *g* Diazobenzolsulfonsäure und dann noch zweimal mit einer solchen von 0·5 *g* ausgeschüttelt. Die erste Fraktion zeigt unter dem Mikroskop betrachtet, zwei Kristallformen: lange Nadeln, in welcher Form der Azofarbstoff des 2.4-Dimethylpyrrols kristallisiert[1]), und daneben büschelförmig vereinigte Nädelchen. Die zweite und dritte Fraktion besteht nur aus letzteren. Dieser Azofarbstoff wird zur Reinigung in n/10-Natronlauge gelöst, die Lösung mit Wasser und Alkohol verdünnt und dann mit n/10-Salzsäure gefällt. Er erweist sich nach seiner Zusammensetzung ($C_{14}H_{19}O_3N_3S$) und nach seinem Verhalten als der des 2.4-Dimethyl-5-äthyl-pyrrols.

Die Aufspaltung des Bis(2.4-dimethyl-3-azetylpyrryl)methylmethans war also unter Absprengung der Azetyle unter den eingehaltenen Bedingungen erfolgt, was den Rückschluß gestattet, daß in den vom Hämatin abstammenden Porphyrinen eine ähnliche Bindungsart angenommen werden kann.



* * *

An Stelle des Formaldehyds hatten *Piloty*, *Stock* und *Dormann*[2]) Chloroform und Alkali zur Verknüpfung zweier Pyrrolkerne verwendet, wobei sie direkt zum Pyrrylpyrrolenylmethan, also zum Farbstoff gelangten, da drei Moleküle Chlorwasserstoff aus-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**. 482 (1912).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 400, 1124, 2531 (1914).

traten. Als Zwischenprodukt beobachteten sie einen Aldehyd des Pyrrols, und so besteht eine zweite Möglichkeit, Pyrrylpyrrolenylmethanderivate mit verschiedenen Seitenketten in den Pyrrolkernen zu erhalten, darin, daß Pyrrolaldehyde mit Pyrrolen unter dem Einfluß von Mineralsäuren zu den gewünschten, zweikernigen Pyrrolderivaten kondensiert werden, das zweite Pyrrol reagiert hiebei in der Pyrrolenform:

```
\                /CO         H₂\                /
 C  =  C <  H                   >C  —  C
 |          \NH     +        N<        ||          ——→
/C  =  C <                      \C  —  C
                                /          \

                        /C'\
                       /  H \
——→  \C  =  C/               \C  ---  C/
      |         \NH        N<          ||
     /C  =  C/                 \C  —  C\
```

Von den bekannten Pyrrolaldehyden[1]) ist der von *Plancher* und *Ponti*[2]) zuerst dargestellte, dann von *Piloty*[3]) leicht zugänglich gemachte $\alpha\,\alpha'$-Dimethylpyrrolaldehyd zu Kondensationen obiger Art herangezogen worden. Eine solche Kondensation sei hier als Beispiel aufgeführt, obwohl die β-Substitution durch das Methin Stoffe erzeugt, die keine Beziehung zu den Blutfarbstoffderivaten haben können, da eine entsprechende Reaktion, die zur Verknüpfung der Pyrrole in α-Stellung führt, hier noch aussteht.

Zur Darstellung des $\alpha\,\alpha'$-Dimethylpyrrolaldehydes werden 35 *g* $\alpha\,\alpha'$-Dimethylpyrrol[4]) in 150 *g* Chloroform und 250 cm^3 Alkohol gelöst und die Lösung mit 65 cm^3 wässeriger Kalilauge (1 : 1) versetzt. Es tritt dann bald unter lebhaftem Aufsieden der Flüssigkeit und unter Abscheidung von Kaliumchlorid die Reaktion ein, welche dann durch kurzes Aufkochen auf dem Wasserbade beendet wird. Durch Zusatz von viel Wasser wird das Salz aufgelöst und die Chloroformschicht kann abgelassen werden. Die wässerige Schicht wird dann noch zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt; sämtliche

---

[1]) *Bamberger* und *Djierdjian*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**. 536 (1900); *Knorr* und *Hess*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 2626 (1912).

[2]) *Atti R.* Accad. dei Lincei Roma. (5.) **18**. II. 469 (1909).

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 2531 (1914) mit *W. Krannich* und *H. Will*.

[4]) *Paal*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**. 2251 (1885); *Knorr*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**. 299, 1558; Ann. d. Chem. **236**. 296 (1886).

Extrakte werden stark eingeengt und der Rückstand einer Wasserdampfdestillation unterworfen, durch welche neben unverändertem Dimethylpyrrol ein chlorhaltiges Produkt und ein höher als das Pyrrol siedendes Öl entfernt werden. Der nicht flüchtige Rückstand wird mit Chloroform extrahiert und die Extrakte nach dem Trocknen völlig eingedampft, wobei der Aldehyd als schwach rötliche Masse zurückbleibt, der durch Waschen mit etwas Äther eine geringe Menge sirupöser Bestandteile entzogen werden kann. Die Ausbeute an rohem Aldehyd beträgt 6 *g*. Zur Reinigung wird 1 *g* in 6 cm^3 Chloroform gelöst und die Lösung mit 2 cm^3 Gasolin bis zur eben beginnenden Trübung versetzt. Beim Stehen in Eis kristallisiert der Aldehyd in nahezu farblosen Drusen, die von gezackten Blättchen gebildet werden. Der Schmelzpunkt liegt bei 141°. Der Aldehyd zeigt keine reduzierenden Eigenschaften, wird auch durch Ferrizyankalium nicht oxydiert. Er gibt die Fichtenspanreaktion, löst sich in heißem Wasser, Alkohol und Chloroform leicht, in Äther schwer, in Petroläther nicht.

Kondensation des $\alpha\,\alpha'$-Dimethylpyrrol-β-aldehydes mit $\alpha\,\alpha'$-Dimethylpyrrol.

2 *g* des Aldehyds und 2 *g* des Pyrrols werden in 5 cm^3 konzentrierter Salzsäure gelöst, wobei unter lebhafter Erwärmung Dunkelbraunfärbung eintritt, wird nun eine Minute auf dem Wasserbade erwärmt und dann mit Eis gekühlt, so erstarrt die ganze Masse zu einem Brei orangeroter, feiner Nadeln, welche das Chlorhydrat des Kondensationsproduktes vorstellen. Sie werden abgesaugt (Ausbeute 2·6 *g*) und zur Reinigung in kaltem, absolutem Alkohol gelöst, aus welcher Lösung nach vorsichtigem Zusatz von Äther derbe rotbraune Nadeln mit stahlblauem Oberflächenglanz auskristallisieren, die bei 250° etwas zusammensintern und bei sehr hoher Temperatur verkohlen. Aus der wässerigen Lösung des Salzes wird die Base durch Natronlauge zunächst in Form gelber, amorpher Flocken ausgefällt. Sie ist in Alkohol, Chloroform, Azeton und Pyridin leicht löslich, in Äther und Wasser schwer löslich. Aus Chloroform und Äther kann sie in Form kurzer, dicker Stäbchen erhalten werden. Aus der Zusammensetzung des Chlorhydrates, welche durch die Formel $C_{13}H_{17}N_2Cl$ wiederzugeben ist, folgt, daß die Kondensation im Sinne der Gleichung:

$$C_7H_9ON + C_6H_9N + HCl = H_2O + C_{13}H_{17}N_2Cl$$

verlaufen ist.



$$
\begin{array}{ccccccc}
 & & & & & & /CH_3 \\
H_3C - C = C - CO & & & & HC = C & & \\
\quad / \qquad\quad | & & H & + & | \qquad \backslash & & \\
HN \qquad\quad | & & & & | \qquad NH & = H_2O + & \\
\quad \backslash \qquad\quad | & & & & | \qquad / & & \\
H_3C - C = CH & & & & HC = C & & \\
 & & & & & \backslash CH_3 &
\end{array}
$$

$$
\begin{array}{ccccc}
 & & C & & /CH_3 \\
 & H_3C - C = C/ & H & C - C/ & \\
+ & \quad / \qquad\quad | & & | \qquad \backslash & \\
 & NH \qquad\quad | & & | \qquad N & \\
 & \quad \backslash \qquad\quad | & & | \qquad / & \\
 & H_3C - C = CH & & HC = C & \\
 & & & & \backslash CH_3
\end{array}
$$

* * *

Die Kondensation von zwei Molekülen des Hämopyrrols zu einem Dipyrrylmethanderivat kann sowohl mit Chloroform und Alkali[1]) wie mit Formaldehyd und Salzsäure[2]) bewirkt werden. Im ersten Fall treten drei Moleküle Chlorwasserstoff aus und es bildet sich die Farbbase. Da letztere auch durch Formaldehyd entsteht, muß bei dieser Reaktion der Sauerstoff der Luft die primär gebildete Leukoverbindung oxydiert haben. Merkwürdigerweise führt auch die Kondensation von Perchloräthan mit Hämopyrrol[3]) zu dem gleichen Produkt und nicht zu einem vier Pyrrolkerne haltendem Gebilde. Analog führt die Kondensation von Glyoxal mit Phonopyrrolkarbonsäureester zu demselben Produkt wie die Verwendung von Formaldehyd.

Die Kondensation von Hämopyrrol mit Formaldehyd wird in der Weise ausgeführt, daß ein Gemisch von 2 *g* des Pyrrols, 5 cm^3 Alkohol und 1·1 cm^3 40%iger Formaldehydlösung mit fünf Tropfen konzentrierter Salzsäure zum Sieden erhitzt wird, wobei unter Rotfärbung eine stürmische Reaktion eintritt. Nach einer Minute wird in Sodalösung gegossen und ausgeäthert. Die ätherische Lösung wird abdestilliert und der Rückstand zwei bis drei Minuten im siedenden Wasserbade im Vakuum erhitzt, um das überschüssige Hämopyrrol zu entfernen. Sodann wird wieder in wenig Äther gelöst, mit 30 cm^3 10%iger ätherischer Pikrinlösung versetzt und in Eis gestellt, wonach beim Stehen über Nacht zirka 0·6 *g* Pikrat erhalten werden. Durch eine

[1]) *Piloty, Stock* und *Dormann*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47.** 403 (1914).

[2]) *H. Fischer* und *K. Eismayer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47.** 2021.

[3]) *Piloty, Stock* und *Dormann*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47.** 1124 (1914).

Umkristallisation aus Chloroform-Petroläther wird es in Form verfilzter Nadeln erhalten, die bei 186° unter Zersetzung schmelzen. Aus diesem Salz läßt sich die Base $C_{17}H_{26}N_2$ durch Natronlauge gewinnen; sie wird in Äther aufgenommen und aus Alkohol-Wasser (1:1) umkristallisiert, wodurch sie in Form bronzeglänzender, brauner, rhombischer Blättchen erhalten wird. Die Lösung der Base in Äther ist rot und zeigt starke, rote Fluoreszenz; auch in Chloroform, Essigester, Azeton, Alkohol und Petroläther ist sie leicht, sehr schwer ist sie in Wasser löslich. Der Schmelzpunkt wird von *Piloty* bei 99·5 bis 100°, von *H. Fischer* bei 108° liegend angegeben. Das salzsaure Salz löst sich mit grüner Farbe in Chloroform und Alkohol, in Wasser und Äther löst es sich schwer. Die alkoholische Lösung zeigt eine nach dem Grünen scharf begrenzte, nach dem Violetten etwas verwaschene Bande, welche das ganze Blau zudeckt. Die Kondensation vollzieht sich nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{l} H_5C_2-C=CH\diagdown \\ \qquad\;\; | \qquad\qquad >NH \\ H_3C-C=C\diagup \\ \qquad\qquad\quad \diagdown CH_3 \end{array} + \begin{array}{c} Cl\;C\;Cl_2 \\ | \\ H \end{array} + \begin{array}{l} \qquad\quad HC=C-C_2H_5 \\ \qquad\;\; \diagup \qquad\;\; | \\ HN \\ \qquad \diagdown C=C-CH_3 \\ H_3C\diagup \end{array} = 2\,HCl +$$

$$+ \begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad C \\ \qquad\qquad\qquad\qquad \diagup \;\; H \;\; \diagdown \\ H_5C_2-C=C\diagup \qquad Cl\diagdown \qquad \diagup C-C-C_2H_5 \\ \qquad\;\; | \qquad\;\; >NH \qquad\quad >N< \qquad\quad \| \\ H_3C-C=C\diagdown \qquad H\diagup \qquad \diagdown C-C\diagdown \\ \qquad\qquad\quad \diagdown CH_3 \qquad\quad \diagup \qquad\qquad CH_3 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad H_3C \end{array}$$

Die Kondensation von Glyoxal und Phonopyrrolkarbonsäureester tritt schon in neutraler Lösung ein: Man erhält eine Lösung von 1 *g* des Esters in 3 cm^3 absoluten Alkohols, gemischt mit einer Lösung von 0·2 *g* Glyoxal in 8 cm^3 absoluten Alkohols, drei Minuten lang im Sieden. Dann wird rasch abgekühlt und die erkaltete Lösung, die nur schwach braun gefärbt ist, mit zehn Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt. Dabei tritt sofort starke Farbvertiefung ein und beim Reiben mit einem Glasstab beginnt die Kristallisation metallisch schimmernder Stäbchen mit grünroten Reflexen. Nach kurzem Stehen wird abgesaugt und die Mutterlauge mit Äther versetzt, wodurch man eine zweite Portion des Salzes erhält. Die Ausbeute beträgt etwa 0·5 *g*. Das Salz ist in Chloroform leicht mit intensiv roter Farbe löslich und wird aus dieser Lösung durch Petroläther gefällt. Nach Zerlegung des Salzes mit Natronlauge kann man die freie Base in Äther überführen, den Rückstand des Äthers nimmt man dann in wenig siedendem Alkohol auf, filtriert und setzt zu dem Filtrat

etwas heißes Wasser, worauf sich beim Erkalten die Base in derben braungelb gefärbten Kristallen mit grünlich schillerndem Oberflächenglanz abscheidet; sie schmilzt bei 110 bis 112°.

Aus der Zusammensetzung des salzsauren Salzes $C_{31}H_{29}O_4N_2Cl$ und aus den Eigenschaften geht hervor, daß sich dasselbe Produkt wie bei der Kondensation des Phonopyrrolkarbonsäureesters mit Formaldehyd gebildet hat, und zwar nicht die Leukoverbindung, sondern gleich die Farbbase:

```
                                    C
                                  / H \
COOR                             /     \                    COOR
 |                              /       \                    |
CH2 — CH2 — C = C                         C — C — CH2 — CH2
            |     >NH           N/        ‖
      H3C — C = C — CH3    H3C—C—C — C — CH3
```

Bei der Verseifung des Esters mittels Natriummethylat im siedenden Wasserbade (auf 0·8 *g* des salzsauren Salzes werden 15 cm^3 10%iges Methylat genommen) scheidet sich ein brauner Niederschlag ab, der nach zehn Minuten durch Zusatz von 15 cm^3 Wasser gelöst wird. Dann beläßt man noch eine Stunde im siedenden Wasserbade und säuert nach dem Erkalten vorsichtig mit Essigsäure an. Wird nun die saure Lösung mit Äther geschüttelt, so scheidet sich das Reaktionsprodukt in Form von derben, grünbraun schillernden Kristallen ab. Die Substanz schmilzt bei 240° unter Zersetzung. Durch Natriumamalgam wird sie rasch gespalten, wonach Phonopyrrolkarbonsäure isoliert werden kann.

* * *

Ein vierkerniges Pyrrolderivat wurde durch die Verkettung von Glyoxal mit 2.4-Dimethyl-3-azetylpyrrol mittels Salzsäure gewonnen[1]).

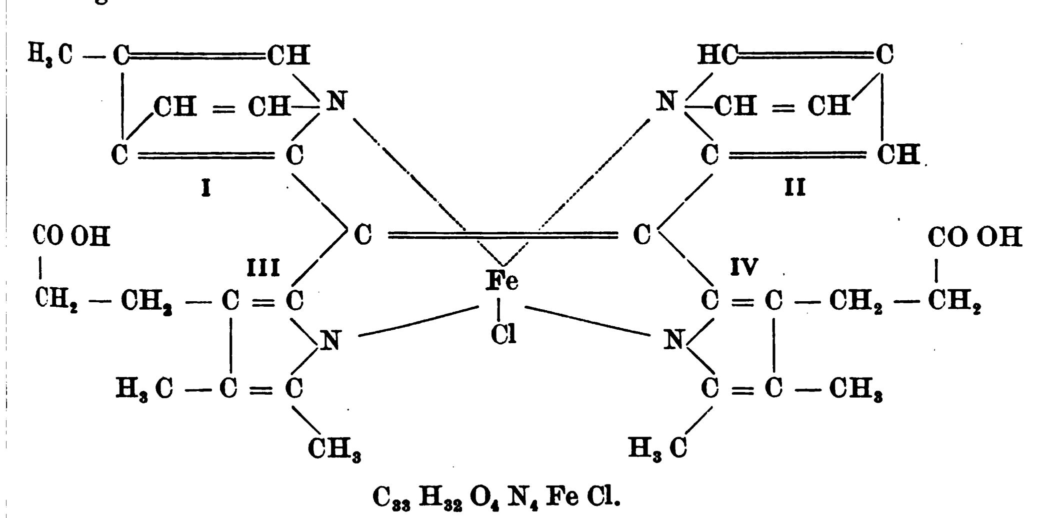
2 *g* des Pyrrols werden in 5 cm^3 Alkohol gelöst und die abgekühlte Lösung von 0·5 *g* Glyoxal in 10 cm^3 Alkohol zugefügt. Auf Zusatz von zehn Tropfen konzentrierter Salzsäure erwärmt sich das Gemisch von selbst und gerät ins Sieden, worauf die Reaktion durch Kochen auf freier Flamme beendet wird. Die Kristallisation des Kondensationsproduktes beginnt schon in der noch heißen Flüssigkeit und wird durch halbstündiges Stehen bei ZT. vollständig. Die Ausbeute beträgt 1·5 *g* an einem salzsauren Salz, dem nach der Analyse die Formel $C_{34}H_{43}O_4N_4Cl$ zukommt, wonach die folgende Konstitution anzunehmen ist:

1) *H. Fischer* und *K. Eismayer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47.** 2026 (1914).

```
H3C — CO — C = C — CH3    H3C — C = C — CO — CH3
           |      >NH       HN<      |
     H3C — C = C                C = C — CH3
                \              /
                 >CH  —  HC<
                /              \
     H3C — C = C                C = C — CH3
           |      >NH       HN<      |
  H3C OC — C = C — CH3    H3C — C = C — CO — CH3
```

Die Substanz kristallisiert in farblosen, derben Prismen und erinnert in ihrem Verhalten nicht an die Leukoverbindungen der Porphyrine, insbesondere erhält man bei der Oxydation nur das „Urobilinspektrum“.

Diese Feststellung ist von Bedeutung für die Auffassung der Farbstoffnatur der Porphyrine. Hierüber sind die Meinungen noch geteilt. Während *W. Küster* eine Verknüpfung der vier Pyrrolkerne durch vier Methine ins Auge faßte, nimmt *Willstätter*[1]) an, daß als farbgebender Komplex die Gruppe >C = C<, an welche die vier Pyrrolkerne gekettet sind, allein fungiere und gibt das folgende Bild für das Hämin:



$C_{33}H_{32}O_4N_4FeCl$.

Durch Addition von zwei Wasserstoffatomen an die Gruppe >C = C< würde sich demnach eine Leukoverbindung ergeben, die, wie ersichtlich, mit dem soeben beschriebenen, synthetisch erhaltenen,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 87. 423 (1913).

vierkernigen Pyrrolderivat in bezug auf die farbgebende Gruppe Übereinstimmung zeigt. Die Eigenschaften des letzteren weisen nun aber, wie erwähnt, nicht darauf hin, daß man es mit der Leukoverbindung eines Porphyrins zu tun hat, was in Verbindung mit der Tatsache, daß das bestbekannte Leukoporphyrin, das Mesoporphyrinogen *H. Fischers*, vier Atome Wasserstoff mehr enthält als das zugehörige Mesoporphyrin, gegen die Auffassung *Willstätters* spricht. Auch lassen sich noch andere Beobachtungen anführen, welche mit dem Bilde *Willstätters* nicht in Einklang zu bringen sind. Er zeigt z. B. an den Pyrrolkernen I und II drei Wasserstoffatome; danach müßten das Hämin und die Leukoverbindungen der Porphyrine die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion zeigen, was nicht der Fall ist. Ferner läßt sich aus dem Bilde *Willstätters* ablesen, daß bei der reduktiven Aufspaltung weder Hämo-, noch Phyllopyrrol gebildet werden kann (bei der Vertauschung des Methyls mit den Brückenkohlenstoffatomen weder Krypto-, noch Phyllopyrrol), wohl aber sollte sich ein 2-Methyl-4-äthylpyrrol und ein 4-Äthylpyrrol aus Pyrrolkern II bilden können. Beide Pyrrole konnten aber bisher nicht beobachtet werden.

Es darf daher auch die Frage aufgeworfen und diskutiert werden, ob zwei andere charakteristische Merkmale des Bildes von *Willstätter*, durch welche es sich von dem Bilde *W. Küsters* wesentlich unterscheidet, in den Eigenschaften des Hämins und in denen der mit ihm in Beziehung stehenden Porphyrine begründet sind. Das eine Merkmal ist die Brückenbindung, das andere das Vorhandensein von vier echten Pyrrolkernen, mit deren Annahme die Auffassung vertreten wird, daß im Hämin basische Eigenschaften nicht vorhanden sind, daß sie vielmehr erst mit der Herausnahme des Eisens entstehen, denn die Porphyrine sind zweisäurige Basen. Somit ergibt sich dann das folgende Bild für das Mesoporphyrin mit zwei echten Pyrrol- und zwei (basischen) Pyrrolenkernen:

```
                                              H2C — CH2
                                               |     |
                H3C — C — CH                   C  —  C
                      ‖     \\                //     ‖
                      ‖       N            N<        ‖
                      ‖     /                \       ‖
       H3C — CH2 —  C — C                      C  —  CH
                           \\                //
                             \\            //
 CO OH                         > C  —  C <                     CO OH
 |                            /          \                       |
 CH2 — CH2 — C = C                          C = C — CH2 — CH2
             |     \                       /    |
             |      >NH               NH<       |
             |     /                       \    |
        H3C — C = C — CH3        H3C — C  =  C — CH3.
```

zu welchem Bilde noch erwähnt sei, daß sich das des Mesohämins aus ihm durch Ersatz der Imidwasserstoffatome durch die Chlorferrigruppe

$$>Fe\,Cl$$

ergeben muß.

Diese Bilder von *Willstätter* für das Hämin und die Porphyrine sind dem Bedürfnis entsprungen, eine Erklärung dafür zu geben, daß die Umwandlung des Hämins in ein Porphyrin, also die Loslösung der Chlorferrigruppe bisher nach der Anschauung *Willstätters* nicht möglich gewesen ist, ohne daß nicht auch gleichzeitig das zweite Paar ungesättigter Stellen im Häminmolekül alteriert wurde; ein zweiter Grund, der zur Aufstellung dieser Bilder und damit zur Annahme einer intramolekularen Umlagerung bei der Porphyrinbildung führte, entstammt der Tatsache, daß das Hämin nicht fähig ist, mit verdünnten Säuren Salze zu geben, im Gegensatz zum Vorhandensein des ausgesprochen basischen Charakters der Porphyrine.

Die zuerst erwähnte Anschauung fußt aber nur insofern auf einer Tatsache, als das zum Hämin gehörige Porphyrin noch nicht im reinen Zustande hat dargestellt werden können; eine Lösung des Leukoporphyrins oder des Porphyrinogens des Hämins haben *H. Fischer* und *F. Meyer-Betz*[1]) in Händen gehabt, nachdem sie das Hämin mit Natriumamalgam reduziert hatten. Denn diese an der Luft sich rasch rötende Lösung gab durch Oxydation zwar Hämatinsäure, aber kein Methyläthylmaleinimid, was der Fall hätte sein müssen, wenn das zweite Paar ungesättigter Stellen (also die Brücke *Willstätters*) gleichzeitig mit der Loslösung des Eisens reduziert worden wäre. Ferner müßte, wenn diese beiden Vorgänge wirklich untrennbar wären, mit der Veränderung des zweiten Paares ungesättigter Stellen auch eine Loslösung des Eisens eintreten. Dies ist aber nicht der Fall. Denn bei der Einwirkung von Bromwasserstoffeisessig auf Hämin und nachfolgender Umsetzung des Reaktionsproduktes mit Methylalkohol entsteht neben dem Dimethyläther des Hämatoporphyrins ein Dihydrodimethoxyhämin. Es hat also primär lediglich zweimal Anlagerung von Bromwasserstoff stattgefunden und sekundär ist das Brom durch Methoxyl ersetzt worden. Allerdings entsteht dieses Produkt nur in geringer Menge. Endlich läßt sich Hämin in Mesohämin direkt überführen, ohne daß es zur Abspaltung von Eisen kommt (vgl. S. 220, und 230).

Die Reduktion des zweiten Paares ungesättigter Stellen im Häminmolekül hat also keinen Einfluß auf die Fähigkeit, das Eisen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 227 (1911); **82**. 104 (1912).

komplex zu binden, womit in voller Übereinstimmung steht, daß das Mesoporphyrin die Chlorferrigruppe sowie andere Metalle in komplexe Bindung wieder aufnimmt. So entsteht Mesohämin oder das hydrogenisierte Hämin *Zaleskis*, denn beide Stoffe sind identisch. Hämin aber und Mesohämin gleichen sich in allen Eigenschaften vollständig, vom äußeren Habitus angefangen bis zum Spektrum der alkalischen oder sauren Lösungen. Da ist es schwerlich angebracht, beiden Stoffen eine verschiedene Konstitution anzuweisen. Es müßte also mit dem Ersatz der beiden Imidwasserstoffatome durch die Chlorferrigruppe wieder eine intramolekulare Umwandlung eintreten, so daß sich dann auch im Mesohämin, das ja gerade so wenig wie das Hämin mit verdünnten Säuren Salze bildet, vier echte Pyrrolkerne befinden. Aber selbst wenn diese zweite Umwandlung, so wenig wahrscheinlich sie erscheint, Platz greifen könnte, ein wesentlicher Unterschied in der Konstitution dieses Mesohämins gegenüber dem Hämin muß bestehen bleiben: das Fehlen der „Brücke“ im ersteren. Gerade diese Brückenbindung bewirkt aber nach *Willstätters* Auffassung die Festigkeit der Bindung des Eisens im Hämin. So sollte also das Eisen aus dem Mesohämin leichter entfernbar sein, während gerade das entgegengesetzte Verhalten beobachtet werden konnte, was damit zusammenhängen muß, daß das Mesohämin der reduzierte, also stabilere Stoff ist.

Nach allem können die Vorstellungen *Willstätters* keine befriedigende Erklärung für die besprochenen Vorgänge enthalten, und da nun das Mesohämin, welches gerade so wenig ausgeprägt basische Eigenschaften wie das Hämin aufweist, doch aus dem stark basischen Mesoporphyrin dadurch entsteht, daß zwei Wasserstoffatome durch die Chlorferrigruppe ersetzt werden, so muß eben in diesem Vorgang allein der Grund für den Umschlag in den Eigenschaften erblickt werden. Mit anderen Worten: Im Mesohämin sind zwar die basischen Eigenschaften des Mesoporphyrins noch vorhanden, sie werden aber durch die Chlorferrigruppe intramolekular kompensiert, und das gleiche gilt für das Hämin, in welchem Stoff also ebenfalls bereits zwei (basische) Pyrrolenringe neben zwei echten Pyrrolkernen vorhanden sein müssen. Diese Beziehung zwischen den basischen Stellen und der Chlorferrigruppe kann bildlich zum Ausdruck gebracht werden und gibt auch eine befriedigende Erklärung für die Festigkeit der Bindung des Eisens. Sollen wir nun dieses Bild so gestalten, wie es zuerst *Willstätter* getan hat, sollen wir uns das Eisen mit zwei Hauptvalenzen an zwei echte Pyrrolkerne und mit Nebenvalenzen an die beiden Pyrrolenringe verkettet vorstellen? Es fragt sich, ob nicht eine gleichmäßige Verteilung der Eisenvalenzen, indem man den Unterschied zwischen Haupt- und Nebenvalenz fallen läßt, den Vorzug verdient.

Zunächst harmoniert das Vorhandensein von zwei Pyrrolenkernen neben zwei echten Pyrrolringen in allen Häminen und Porphyrinen vortrefflich mit ihrem Charakter als Farbstoffe, da die Pyrrolenstruktur dem chinoiden Bau an die Seite zu setzen ist, das echte Pyrrol dem benzoiden Typus; durch die Kombination beider Zustände ergeben sich ja bekanntlich gefärbte Stoffe. Für die Porphyrine wird aber die symmetrische Abwechslung zwischen echten Pyrrol- und Pyrrolenkernen noch die Ursache für die Fähigkeit, Metalle komplex zu binden, denn mit ihrer Aufhebung verschwindet diese Fähigkeit. Sie hängt eben, wie in vielen anderen Fällen, damit zusammen, daß der betreffende Stoff in mehreren Modifikationen auftreten kann, die sich in einem Gleichgewicht befinden, was wiederum auf die Beweglichkeit von Wasserstoffatomen zurückzuführen ist. Wenn danach die Porphyrine dem zu verdoppelnden System:

```
                 C
                /H\\
               /    \\
    — C = C           C — C —
      |     \        /    ||        ⟶
      |      >NH  N<      ||        ⟵
      |     /        \    ||
    — C = C —      — C — C —

                          C
                        //H \
                       //     \
            — C — C             C = C —
  ⟶           ||     \        /     |
  ⟵           ||      >N   NH<      |
              ||     /        \     |
            — C — C —       — C = C —
```

die Fähigkeit, Metalle komplex zu binden, verdanken, kann diese Bindung, des Eisens z. B., nur so versinnbildlicht werden, daß es mit allen vier Stickstoffatomen verkettet erscheint. Da nun ferner die Pyrrolkerne andere Substituenten tragen wie die Pyrrolene, ist damit zu rechnen, daß es z. B. zwei verschiedene Mesoporphyrine darzustellen gelingen könnte, die beide dasselbe Mesohämin geben. Beide Mesoporphyrine werden endlich auch durch Anlagerung von zweimal zwei Atomen Wasserstoff dasselbe Mesoporphyrinogen geben und, da in letzterem eine Wanderung der Wasserstoffatome nicht mehr stattfinden kann, denn es sind ja nur noch echte Pyrrolkerne vorhanden, verschwindet damit die Fähigkeit, Eisen und andere Metalle in komplexe Bindung aufzunehmen. Leukoverbindungen der Hämine können also nicht existieren, wenn das Eisen an alle vier Stickstoffatome gleichartig gebunden ist. Die

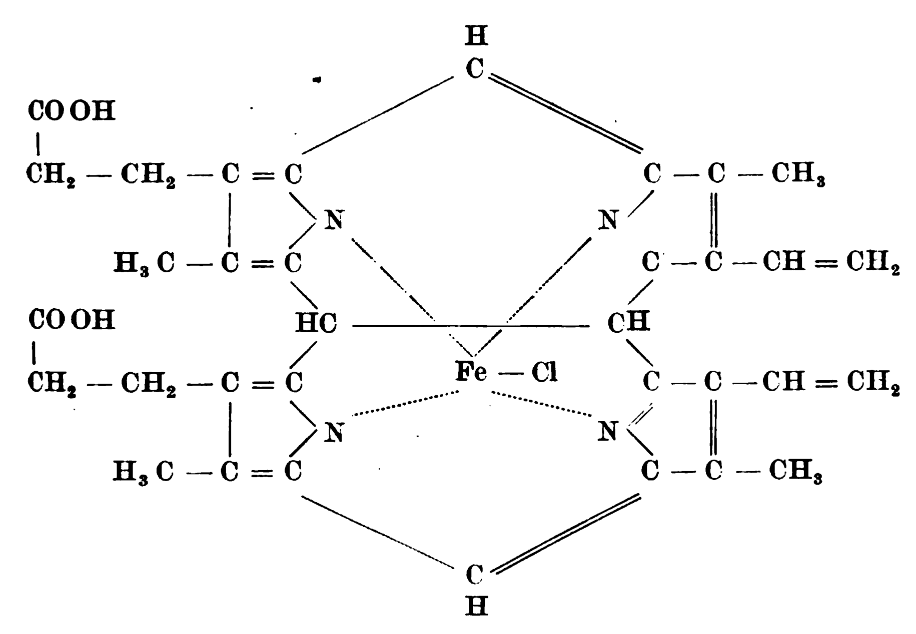
Beobachtungen, daß das Eisen bei der Reduktion des Hämins bis zur Farblosigkeit abgespalten wird und daß das Mesoporphyrinogen nicht befähigt ist, Eisen komplex zu binden, finden also in einem Bilde, in welchem das Eisen mit allen vier Stickstoffatomen des Porphyrinmoleküls in gleicher Weise verbunden ist, ihren einzigen sachgemäßen Ausdruck.

Die Formulierung des Hämins durch *Willstätter* würde auch die Möglichkeit in sich schließen, daß bei der Oxydation sowohl wie bei der Reduktion ein Zerfall des Moleküls eintritt, bei dem sich ein zweikerniges Pyrrolderivat bildet. Hievon hat das Experiment bisher keine Andeutung gegeben. Bei gelinder Zufuhr von Sauerstoff in alkalischer Lösung nimmt Hämatin etwas Sauerstoff auf, ohne daß Zerfall eintritt, bei stärkerer Oxydation wird sogleich Hämatinsäure gebildet; in saurer Lösung tritt sie sofort auf. Ganz analog bleibt bei der Reduktion das Porphyrinmolekül unter Anlagerung von Wasserstoff an die ungesättigten Stellen erhalten, tritt Aufspaltung ein, so entstehen einkernige Pyrrolderivate. Ganz anders ist das Verhalten des Bilirubins, denn hier wird unter denselben Bedingungen, bei deren Einhaltung das Porphyrinmolekül intakt bleibt, die zweikernige Bilirubinsäure herausgeschält.

So weisen alle Beobachtungen und dann die chemische Konstitution der bei der Reduktion entstehenden Pyrrole und Pyrrolkarbonsäuren, die teils in α-, teils in α'-Stellung, teils in beiden Stellungen Methyle tragen, darauf hin, daß jeder Pyrrolkern in beiden α-Stellungen mit dem nächsten verknüpft ist. Der Farbstoffnatur entsprechend, müssen diese verbindenden Glieder Methine sein, deren vier in Betracht kommen, was wiederum mit der empirischen Zusammensetzung des Hämins in bezug auf seine 34 Kohlenstoffatome übereinstimmt, da von diesen 30 Atome durch die in $\beta\beta'$-Stellung substituierten vier Pyrrolkerne $(2 \times 7 + + 2 \times 8)$ in Anspruch genommen werden. Als weiterer Beleg für das Vorhandensein der vier Methingruppen kommt die Existenz des Tetrachlor- bezw. Tetrabrommesoporphyrins und des entsprechend in der Vierzahl halogensubstituierten Kot- und des Urinporphyrins in Betracht, von welchen Stoffen nur noch die Fähigkeit zur Komplexsalzbildung nachgewiesen werden sollte, um zu beweisen, daß keines der Halogenatome an den Stickstoff getreten ist.

Wenn somit an dem Vorhandensein von vier die vier Pyrrolkerne verbindenden Methinen festgehalten wird und wenn an Stelle der Brückenbindung des *Willstätter*schen Bildes, mit der die Festigkeit der Bindung des Eisens nicht begründet werden konnte und welche die entwickelte Vorstellung über die Bindung des Eisens an alle vier Stickstoffatome ausschließt, ungesättigte Seitenketten in Form von Vinylen treten, so entsteht als Ausdruck für die Kon-

stitution des Hämins ein Bild, wie es von *W. Küster*[1]) zuerst und lange vor der Formulierung durch *Willstätter* aufgestellt worden ist, und es bleibt nur noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß zwei der Methine in Verbindung stehen. Für diese Auffassung würde die Existenz einer in α-Stellung äthylierten Pyrrolkarbonsäure sprechen (vgl. S. 283), wie sie *Piloty* nach der Reduktion des Hämins isoliert haben will; *H. Fischer* konnte allerdings eine solche Säure bisher nicht auffinden. Nehmen wir den positiven Befund als richtig an, so ergibt sich das folgende Bild für das Hämin, das den analytisch gewonnenen Ergebnissen vollkommen entspricht und für den Aufbau als Vorbild dienen muß, sofern nicht neue Tatsachen unsere Anschauungen in eine andere Richtung lenken sollten. Die Beziehungen der Karboxyle zum Eisen sowohl wie zu den basischen Stellen des Moleküls sind in das Bild nicht aufgenommen, es ist aber sicher, daß solche existieren.



Hämin $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$.

* * *

Bemerkungen für die Analyse.

Alle Häminpräparate verbrennen im offenen Rohr beim Überleiten von Sauerstoff vollständig, neben der Kupferspirale lege man noch eine Silberspirale vor, doch verkürze man hiedurch die

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 469 (1912).

Schicht des Kupferoxyds möglichst wenig und sorge dafür, daß das vorgelegte Kupferoxyd glüht, ehe die Zersetzung des Hämins bewirkt wird. Hämatin verbrennt schwieriger; es muß aufs feinste gepulvert sein und wird am besten mit Kupferoxyd gemischt verbrannt.

Das im Schiffchen zurückbleibende Eisenoxyd kann meist zu einer Eisenbestimmung verwendet werden, man löse es dazu in Salzsäure unter Zusatz weniger Tropfen Salpetersäure auf und fälle mit Ammoniak.

Die Stickstoffbestimmung nach *Dumas* erfordert, auch beim Bilirubin, ziemlich langes und heftiges Glühen; sie wird daher am besten im Porzellanrohr vorgenommen. Nach *Kjeldahls* Methode werden nur dann richtige Werte erhalten, wenn zum Zerstören von je 0·1 *g* Substanz 10 cm^3 rauchende Schwefelsäure unter Zusatz eines Körnchens Kupferoxyd verwendet wurden und das Erhitzen mindestens 24 Stunden dauert.

Zur Zerstörung der Hämine durch Salpetersäure bei Cariusbestimmungen, die jeder anderen Art vorzuziehen sind, genügt fünfstündiges Erhitzen auf 130°; im Filtrat vom Chlorsilber läßt sich das Eisen bestimmen. Die Alkylbestimmungen nach *Zeisel* geben sehr genaue Resultate. Vortreffliche Dienste hat die *Pregl*sche Mikroanalyse auf dem Gebiete des Blut- und der Gallenfarbstoffe geleistet.

Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte des Bilirubins.

Von **William Küster**, Stuttgart.

Die Gallenfarbstoffe, von denen bisher nur das Bilirubin im kristallinischen Zustande hat dargestellt werden können, sind als Derivate der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes aufzufassen. Dies folgt nicht nur aus einer großen Anzahl von Beobachtungen und Versuchen am lebenden Wirbeltier[1]), es geht auch mit aller Schärfe aus den Resultaten hervor, welche der Abbau des Bilirubins durch Oxydation oder durch Reduktion gezeitigt hat. Freilich zeigen sich schon in den Eigenschaften des Bilirubins so wesentliche Unterschiede von denen der Porphyrine (vgl. S. 223), welche als eisenfrei mit dem Bilirubin am ehesten zu vergleichen sind, daß an einfache Beziehungen zwischen Hämatin und Bilirubin nicht gedacht werden darf. Vor allem sei darauf hingewiesen, daß das Bilirubin im Gegensatz zu den Porphyrinen nicht imstande ist, komplexe Salze mit Metallen zu geben, was auf eine Verschiedenheit in der Anordnung der Stickstoffatome hinweist, die allerdings noch in der Vierzahl im Bilirubin vorhanden sind, da an diesen ja die Bindung der Metalle erfolgt. Auch ist von einer Isomerie des Bilirubins mit irgendeinem Porphyrin höchstwahrscheinlich keine Rede, und wenn es der Fall wäre, so dürfte diesem Befund kein größeres Gewicht zugeschrieben werden, als der schon erwähnten Tatsache, wonach aus den Abbauprodukten die chemische Verwandtschaft zwischen Blut- und Gallenfarbstoff hervorgeht. Im Zusammenhang hiemit sei schon hier angeführt, daß das Urobilin des Harns aus zwei Quellen stammen kann; entweder ist es aus Stoffen hervorgegangen, die sich direkt auf das Hämatin zurückführen lassen, oder aus solchen, die aus ihm auf dem Umwege über das Bilirubin entstanden sind.

Es ist nun sicher, daß die Umwandlung des Hämatins in Bilirubin außer in der Abspaltung des Eisens auf einer Oxydation beruht, wie schon der Vergleich der Formeln für das hypothetische Porphyrin des Hämatins $C_{34}H_{34}O_4N_4$ mit der des Bilirubins

[1]) Eine Zusammenstellung findet sich im Lehrbuch der Physiologie von *Bunge*. II. Teil, S. 441 (1901).

$C_{33}H_{36}O_6N_4$ lehrt. Wie diese Oxydation und die höchstwahrscheinliche Einlagerung von Wasser erfolgt, konnte bisher nicht mit Sicherheit festgestellt werden; da aber das Porphyrin des Hämatins wegen der Leichtveränderlichkeit seiner ungesättigten Seitenketten bis jetzt nicht im reinen Zustande hat hergestellt werden können, ist anzunehmen, daß diese auch bei der in vivo stattfindenden Umwandlung, die zum Gallenfarbstoff führt, beteiligt sind, womit auch experimentell ermittelte Befunde im Einklang stehen. Jedenfalls hat diese Veränderung zur Folge, daß auch eine weitere Oxydation sehr viel leichter als beim Hämatin eintreten kann, und die außer dem Bilirubin in der Literatur aufgeführten Gallenfarbstoffe sind denn auch als Derivate des Bilirubins aufzufassen, bei denen diese Oxydation bereits während des Lebens eingetreten ist, während die der biologischen Oxydation entsprechende Reduktion sich auf den zweiten Teil des Blutfarbstoffes, auf die Eiweißkomponente desselben erstreckt hat.

Gallenfarbstoffe finden sich nun außer in der Galle und in Gallensteinen auch in ikterischen Geweben, im Blutserum, im Urin und im Darm. Hier hat aber eine Reduktion bis zum Mesobilirubinogen stattgefunden, und dieser Stoff läßt sich in pathologischen Fällen aus dem Urin gewinnen. Er oxydiert sich leicht und zwar an verschiedenen Stellen des Moleküls, so daß das entstehende „Urobilin" kein chemisches Individuum, sondern ein Gemisch verschiedener Stoffe vorstellt, auch dann, wenn es nur dem Bilirubin entstammt. Neben den Derivaten der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes können sich bei Pflanzennahrung auch Chlorophyllabkömmlinge in der Galle vorfinden; als ein solches wurde z. B. das Bilipurpurin[1]) oder Phylloerythrin[2]) erkannt, dem die Formel $C_{34}H_{36}O_6N_4$ zukommen dürfte und das ein komplexes Kupfersalz[3]) liefert, womit es sich den Porphyrinen zugesellt und sich von den Gallenfarbstoffen unterscheidet.

Zur Gewinnung von Gallenfarbstoffen eignen sich am besten Gallensteine aus der Gallenblase des Rindes, die immerhin häufig vorkommen und meist in reichlicher Menge Farbstoff enthalten, während das Cholesterin zurücktritt. Die Farbe solcher Konkremente ist ziegelrot, die Größe derselben wie ihre Gestalt wechselt, am häufigsten erscheinen sie als kugelförmige Gebilde mit konzentrischer Schichtung bis zu 5 *cm* Durchmesser, seltener sind vollkommen ausgebildete Tetraeder von gleicher Länge der Seitenkante; eine Schichtung ist auch hier zu erkennen[4]).

---

[1]) *Löbisch* und *Fischler*: Monatsh. f. Chem. **1903.** 159.
[2]) *Marchlewski*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **43.** 464; **45.** 466 (1904/05).
[3]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **96.** 292 (1916).
[4]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26.** 314 (1898).

In den Gallengängen von Pferden können sich ebenfalls Konkremente finden, die zum großen Teile aus Farbstoff bestehen; sie sind von geringerem Umfang als die Gallensteine des Rindes, etwa von Johannisbeer- bis Kirschkerngröße und tiefbraun gefärbt[1]).

Auch die Gallensteine des Menschen, die häufig die Form von Tetraedern besitzen, enthalten Farbstoffe, doch tritt die Menge derselben gegenüber dem Cholesterin stark zurück. *Staedeler*[2]) bezeichnete die neben dem Bilirubin vorkommenden Farbstoffe als Biliprasin, Bilifuscin und Bilihumin. Indessen liegen chemische Individuen nicht vor; das leicht schmelzende Biliprasin z. B. enthält ganz sicher Fette oder Fettsäuren und Cholesterin oder Ester desselben in enger Bindung mit einem Bilirubinderivat. Und auch das Bilifuscin, welches *Zumbusch*[3]) näher untersuchte, dürfte eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen, dafür spricht die Schmelzbarkeit und der sehr hohe Gehalt an Wasserstoff. Bemerkenswert ist der Befund von *Zumbusch*, wonach der Stickstoff des Bilifuscins sich nach der Methode *Kjeldahls* nicht bestimmen läßt.

Um größere Mengen von Bilirubin darzustellen, benützt man am besten Rindergallensteine, wie es zuerst von *Valentiner*[4]), dann von *Maly*[5]) und *Thudichum*[6]) geschehen ist. Die Galle selbst auf Farbstoffe zu verarbeiten, ist zwar versucht worden, dürfte aber nicht lohnen; auch aus Blutserum läßt sich Gallenfarbstoff herstellen.

Die Aufarbeitung von Gallensteinen aus der Gallenblase des Rindes.

Die frischen Konkremente (man wähle nur solche, welche nach ihrem Aussehen Farbstoff enthalten, denn es finden sich auch Konkremente, die gar keinen Farbstoff führen), die vom anhängenden Schleim gesäubert worden sind, werden zunächst sehr vorsichtig im Heißwassertrockenschrank getrocknet, in einer Porzellankugelmühle zermahlen und durch ein feinstes Sieb getrieben, wobei man mit einiger Vorsicht verfahren muß, weil die intensive Färbekraft des sich gern entwickelnden Staubes recht lästig werden kann.

1. Je 150 *g* des feinen, getrockneten Pulvers werden dann in eine große Hülse von *Schleicher* und *Schüll* (60 : 180) gebracht und

---

1) *W. Küster:* Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 314 (1916).

2) *Liebigs* Ann. d. Chem. **132**. 323 (1864).

3) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 446 (1901).

4) *Günzburgs* Zeitschr. **1858**. 46.

5) Wiener Akad. Ber. II. **57**. 95 (1868); **59**. 597 (1869); *Liebigs* Ann. **132**. 127 (1864); **175**. 76 (1874); **181**. 106 (1876).

6) Journ. f. prakt. Chem. **104**.196 (1868); *Liebigs* Ann. **181**. 242 (1876).

diese in eine entsprechend große Röhre[1]) aus starkem Glas, die ausgezogen worden ist, auf eine groblochige Siebplatte eingestellt, so daß die Hülse stets von den Dämpfen der extrahierenden Flüssigkeit umgeben ist. Zunächst wird 24 Stunden mit Äther extrahiert, der neben Fetten auch zirka 1% Stearinsäure, dann zirka 0·5% Choleinsäure und ein wenig Cholesterin (0·1%), endlich auch einen färbenden Stoff wegnimmt, der von *H. Fischer*[2]) als Karotin identifiziert worden ist (0·008%). Im ganzen beträgt der Verlust etwa 4%, also zirka 6 *g*.

2. Das entfettete und vom Äther wieder vorsichtig befreite Pulver, noch zirka 144 *g*, wird nun in ein hohes Becherglas gebracht und mit 1 *l* siedenden Wassers angerührt, der Brei auf eine Steinzeugnutsche überführt und mit siedendem Wasser ausgezogen, bis das Wasser nahezu farblos abläuft. Hiezu sind vielleicht 15 bis 20 *l* Wasser notwendig, und es werden hauptsächlich gallensaure Salze entfernt. Der durch verdünnte Schwefelsäure aus den ersten Auszügen gefällte Niederschlag löst sich bei der Extraktion mit Äther zum Teil auf, das Gelöste enthält eine Gallensäure. Die unlöslichen Teile sind schwefelhaltig, und zwar sowohl die in Alkohol löslichen, wie die auch in diesem Lösungsmittel unlöslichen Teile. Der im ganzen entstehende Verlust beträgt etwa 5·4% des Pulvers, also zirka 8 *g*; der Rest wiegt also zirka 136 *g*.

3. Als dritte Operation folgt nun die Zersetzung der in dem Pulver vorliegenden Kalzium- und Magnesiumverbindungen der Farbstoffe, Fett- und Gallensäuren durch eine Säure, wodurch auch Phosphate der Erdalkalimetalle in Lösung gehen und daneben auch eine organische Substanz, die der eingedampften, mit Schwefelsäure angesäuerten und vom ausgeschiedenen Gips getrennten Flüssigkeit durch Äther entzogen werden kann; über ihre Natur läßt sich noch nichts aussagen. Als Säure benützt *H. Fischer*[3]) ganz verdünnte Salzsäure, durch welche auch dem Eiweiß nahestehende Stoffe entfernt werden, welche die Biuret- und die *Millon*sche Reaktion geben, *W. Küster* 10%ige heiße Essigsäure, in der Weise, daß sie auf das noch auf der Nutsche befindliche, feuchte Pulver gebracht und die Ablaufröhre solange geschlossen wird, bis die Wirkung der Säure beendet ist, worauf mit Wasser gewaschen und dann wieder Säure aufgegeben wird, bis das Ablaufende weder Ca″ noch Mg″ enthält. Der Verlust beträgt hiebei zirka 18%, also 25 *g*, das Gewicht des Restes demnach zirka 111 *g*.

4. Die Essigsäure wird dann durch Wasser verdrängt, die Masse auf Fließpapier, später im Dampftrockenschrank getrocknet,

---

[1]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 216 (1911).

[2]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**. 331 (1913).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 217 (1911).

wieder in die schon gebrauchte Hülse gefüllt und aufs neue mit Äther erschöpfend ausgezogen, was 24 Stunden oder auch länger dauern kann. Im Extrakt befindet sich ein wenig Bilirubin, das leicht zu gewinnen ist, da es beim Aufnehmen mit Äther zurückbleibt. Was vom Extrakt in Äther löslich ist, läßt sich leicht in eine schwer und eine sehr leicht lösliche Fraktion trennen. Aus ersterer läßt sich Desoxycholsäure gewinnen[1]), da aber zu ihrer Reinigung ein Umkristallisieren aus Eisessig nötig ist, wird sie in Form von Choleinsäure vorgelegen haben[2]). Der Rückstand der in Äther sehr leicht löslichen Teile enthält Stearinsäure, die nach Aufnahme in Schwefelkohlenstoff und Zusatz von Petroläther, wodurch eine harzige Masse gefällt wird, aus dem Filtrat isoliert werden kann. *H. Fischer*[3]) hat ferner in den ätherlöslichen Teilen eine „Lithocholsäure" genannte Gallensäure aufgefunden, die sich durch Geschmacklosigkeit auszeichnet. Ihr kommt die Formel $C_{24}H_{40}O_3$ zu. Der Verlust durch die zweite Ätherextraktion beträgt zirka 3·8%, also zirka 4 *g*. Der Rest wiegt 107 *g*.

5. Letzterer muß nun mit absolutem Alkohol extrahiert werden, was längere Zeit, eventuell einige Tage, in Anspruch nehmen kann. Hiedurch wird ein grüner Stoff in nicht unbedeutender Menge entfernt — beträgt doch die Menge des Gelösten zirka 4·5% — der mit *Staedelers* Biliprasin insofern eine Ähnlichkeit besitzt, als er wie dieses leicht schmilzt. Es mußte sich also um ein Gemenge handeln, in dem Fette oder Cholesterinderivate enthalten sind, was in der Tat der Fall ist, trotz der vorangegangenen Behandlung mit Äther und, da auch die Abtrennung der schmelzenden Teile mit Schwierigkeiten verknüpft ist, so hat es den Anschein, als läge auch hier eine nähere Verbindung der Bestandteile vor, ähnlich wie bei den Stoffen vom Typus der Choleinsäure. Daß unter diesen Bestandteilen ein Derivat des Bilirubins sich befindet, wurde dadurch bewiesen, daß bei der Oxydation Hämatinsäure erhalten werden konnte[4]).

6. Sobald der Alkohol nur noch Spuren des grünen Farbstoffes aus dem Gallensteinpulver aufnimmt, unterbricht man die Extraktion, befreit vom Alkohol und schreitet sofort zur Extraktion mit Chloroform, die zweckmäßig unter Lichtabschluß ausgeführt wird[5]). Die Hülse ist jetzt nur noch zu zwei Drittel

[1]) *W. Küster* und *J. Weller*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**. 463 (1910).

[2]) *Wieland* und *Sorge*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 1 (1916).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 234 (1911).

[4]) *W. Küster* und *K. Reihling*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**. 165 (1915).

[5]) Läßt man das Pulver längere Zeit liegen, so dauert die Extraktion sehr viel länger, weil sich das frei gemachte Bilirubin allmählich in eine schwerer in Chloroform lösliche Modifikation umwandelt, auch erhält man dann gewöhnlich ein gelbbraun verfärbtes Präparat.

mit dem Rest des Gallensteinpulvers (zirka 102 *g*) gefüllt, was zweckentsprechend ist, weil das Chloroform als spezifisch schwererer Körper das Pulver in die Höhe hebt. Die Dauer der Extraktion richtet sich natürlich nach der Menge des vorhandenen roten Farbstoffes; sie wird fast acht Tage in Anspruch nehmen und jedenfalls so lange fortgesetzt, bis das ablaufende Chloroform nur noch ganz schwach gefärbt ist. Danach hat sich im Extraktionskolben der größte Teil des Bilirubins, etwa 25 *g*, orangerot gefärbt, abgesetzt; ein kleiner Teil befindet sich noch in der Lösung und scheidet sich ziemlich vollständig ab, nachdem etwa drei Viertel des Chloroforms durch Abdestillation entfernt worden sind. Was jetzt noch in Lösung bleibt, ist bereits stark verändertes Bilirubin und für die Reindarstellung dieses Farbstoffes nicht mehr zu gebrauchen.

7. Durch die Extraktion mit Chloroform wird stets ein etwas chlorhaltiges Bilirubin gewonnen, und es gelingt nur schwer, diesen Chlorgehalt zu beseitigen. Um diesen Mißstand auszuschließen, kann man die Extraktion des Bilirubins aus den vorbehandelten Gallensteinen auf folgendem Wege bewerkstelligen:

20 *g* desselben werden aufs feinste gepulvert und in einem starkwandigen Arzneiglase mit 100 cm^3 heißem, absoluten Methylalkohol übergossen, alsdann wird getrocknetes Ammoniakgas aufgeleitet, das Glas sicher verschlossen und eine Stunde geschüttelt. Darauf erwärmt man noch einmal vorsichtig im Wasserbade bis zum Sieden des Methylalkohols und sättigt erneut mit Ammoniakgas, worauf sofort abgesaugt und mit zweimal 10 cm^3 heißem Methylalkohol nachgewaschen wird. Aus dem Filtrat setzen sich beim Erkalten nur wenige Kristalle ab, man bewirkt daher durch Eintragen in 1 *l* getrockneten Äthers die Fällung des Bilirubinammoniums und destilliert den Äther langsam ab, wobei unter Entweichen von Ammoniak Bilirubin in einer Ausbeute von etwa 2·5 *g* zurückbleibt, das nun in kristallisiertes Bilirubinammonium überführt werden kann (vgl. S. 329).

Die nach der erschöpfenden Extraktion des Bilirubins auf die soeben angegebene Art oder durch Chloroform verbleibenden Reste des Gallensteinpulvers werden nun von neuem der Behandlung mit 10%iger Essigsäure, Äther, Alkohol und Chloroform unterworfen, wobei dieselben Stoffe wie bei der ersten Behandlung herausgelöst werden, natürlich in viel geringerer Menge; doch lohnt sich diese zweite, eventuell sogar eine dritte und vierte Behandlung mit Rücksicht auf die Kostbarkeit des Bilirubins, von dem immerhin noch einige Gramm erhalten werden können. Bemerkenswert ist, daß das Bilirubin, welches nach wiederholter Einwirkung der verdünnten Essigsäure erhalten wird, rot gefärbt erscheint. Ein wesentlicher Teil des Bilirubins wird aber durch diese Säure praktisch

überhaupt nicht aus seiner Verbindung, die in dem Gallenstein-pulver vorhanden ist, in Freiheit gesetzt und damit durch Chloroform extrahierbar. Dies geschieht erst, wenn das Pulver mit siedendem Eisessig behandelt worden ist und dann wird ein schön rotbraun gefärbtes Bilirubinpräparat erhalten. Es ist daher die Annahme nicht von der Hand zu weisen, daß sich dieser zweite Teil, der allerdings in geringerer Menge, etwa 6 *g*, erhalten wird, noch in chemischer Bindung mit einem anderen Stoff befindet und daß diese Bindung erst durch den Eingriff der konzentrierten Säure gelöst wird. Zugleich wird dieser Stoff, der den Namen Choleprasin erhalten hat[1]), durch die Essigsäure in Lösung überführt, wobei auch ein wenig Bilirubin mitgerissen wird. Daneben finden sich auch noch alkohollösliche Teile im rohen Choleprasin vor, von denen wieder ein Teil als ein Kunstprodukt angesprochen werden muß, das sich unter dem Einfluß der Essigsäure aus dem Bilirubin gebildet hat, während ein zweiter Teil schon im Gallensteinpulver vorhanden gewesen sein muß, da er wieder große Ähnlichkeit mit dem Biliprasin besitzt, wie dieses z. B. eine ganze Reihe verschiedener Stoffe enthält. Das von diesen Teilen und dem anhängenden Bilirubin gereinigte Choleprasin hat sich als ein Eiweißabkömmling erwiesen, unter dessen Spaltprodukten Histidin nachgewiesen, während das Vorhandensein von Valin, Leuzin und Prolin nur sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte und das Fehlen der Reaktionen auf Tyrosin die Abwesenheit dieser Aminosäure sicherstellte[2]). Aus allen diesen Beobachtungen läßt sich aber der Schluß ziehen, daß die Umwandlung der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes in Gallenfarbstoffe sich bereits vollzieht, ehe die Spaltung des Hämoglobins eingetreten ist, und daß auch das Globin eine tiefgreifende Veränderung erfährt. Und da ferner, wie vorausgenommen sein mag, im Gallensteinpulver auch Farbstoffe auftreten, die große Ähnlichkeit mit einem Oxydationsprodukt des Bilirubins aufweisen, so darf geschlossen werden, daß auch in vivo die Umwandlung des Hämatins, die zum Bilirubin führt, über das Stadium des Bilirubins hinausgehen kann. Die dieser biochemischen Oxydation entsprechende Reduktion dürfte das Globin erfahren, und so sind es die Elemente des Wassers, die wie immer bei Vorgängen im Organismus auch bei der Bildung der Gallenfarbstoffe zur Umgestaltung organischer Stoffe herangezogen werden[2]).

8. Zur Wegnahme des Choleprasins aus dem Gallensteinpulver verteilt man den Rest desselben (zirka 70 *g*) auf drei Porzellanschalen, übergießt jede Portion mit 1 *l* kochenden Eisessigs und läßt absitzen. Die erkaltete, dunkelgrüne Lösung wird durch ein

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 297 (1906).

[2]) *W. Küster* und *K. Reihling*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. **94**. 163 (1915).

Kreppfilter abgegossen und der Eisessig unter vermindertem Druck bis auf ein Zehntel des Volumens abdestilliert, worauf er von neuem verwendet werden kann, denn die Einwirkung mit Eisessig muß etwa zehnmal wiederholt werden, bis wenigstens der größte Teil des Choleprasins herausgelöst worden ist[1]). Bei den späteren Extraktionen kann das Filtrat bis auf ein Zwanzigstel seines Volumens eingeengt werden. Die nach Abdestillation des Eisessigs verbleibende Lösung wird jedesmal zur Abscheidung des Choleprasins in 1 *l* Wasser eingetragen, dem ein wenig Salzsäure zugesetzt wird, wodurch die Fällung begünstigt wird. Der auf einem gehärteten Filter gesammelte, sehr voluminöse Schlamm wird säurefrei gewaschen und auf Fließpapier, dann bei mäßiger Wärme getrocknet, worauf er mit Alkohol und dann mit Chloroform erschöpfend extrahiert wird. Durch letzteres geht ein grün gefärbter Stoff in Lösung, dem nach Abdestillation des Lösungsmittels durch Essigsäure Choleprasin entzogen wird, während etwas Bilirubin zurückbleibt.

Die Ausbeute an gereinigtem Choleprasin beträgt etwa 20 *g*; es stellt amorphe, fast schwarze, glasglänzende Stücke vor und kann nicht als ein chemisches Individuum angesprochen werden.

Der mit Eisessig anscheinend erschöpfend behandelte Rest des Gallensteinpulvers wird gesammelt und gründlich ausgewaschen, wobei neben wenig Farbstoff viel Ca'' und Mg'' ins Filtrat geht, trotzdem ja schon mit verdünnter Essigsäure diese Ionen entfernt worden waren. Nach dem Trocknen auf Fließpapier und im Wassertrockenschrank läßt man eine Extraktion mit Äther und eine solche mit Alkohol folgen, worauf man durch Chloroform rotbraunes Bilirubin, wie schon erwähnt, in einer Ausbeute von zirka 6 *g* herauslösen kann.

Der noch übrige Rest des Gallensteinpulvers (zirka 40 *g*) enthält noch Choleprasin und Bilirubin, die durch öftere Wiederholung der Extraktionen mit Eisessig und mit Chloroform gewonnen werden können. Sehr lohnend ist allerdings diese Fortsetzung der Behandlung nicht. Sie ist aber durchgeführt worden bis zur anscheinenden Erschöpfung, um über die Natur des Rückstandes, der mit *Staedeler* als „Bilihumin" bezeichnet werden soll, einige Aufklärung zu erhalten.

Diesbezügliche Untersuchungen haben nun ergeben, daß

1. das Bilihumin nur noch geringe Aschenmengen, zirka 1%, enthält, die hauptsächlich aus Ferriphosphat bestehen;

2. Gallenfarbstoff insofern vorhanden ist, als die Rotfärbung bei der Oxydation mit Salpetersäure als beweiskräftig dafür angesehen wird;

[1]) Glatte Filtration gelingt nur bei Anwendung des angegebenen großen Überschusses an Lösungsmitteln.



3. Eiweißderivate enthalten sind, da nach der Hydrolyse mit Salzsäure allem Anschein nach Aminosäuren auftreten.

Bemerkenswert ist die Fähigkeit des Bilihumins, mit den Alkalien unlösliche Salze zu geben; in dieser Beziehung gleicht es dem durch Oxydation mit Eisenchlorid aus dem Bilirubin hervorgehenden „Bilinigrin" (vgl. S. 337), mit dem das Bilihumin auch in der Zusammensetzung eine gewisse Übereinstimmung zeigt.

Die Reinigung des Rohbilirubins,

das chlorhaltig ist, sofern es mit Chloroform extrahiert worden war und kleine Mengen schwefelhaltiger Stoffe enthält, geschieht durch Überführung in das prachtvoll kristallisierende

Bilirubinammonium[1]).

Zur Darstellung desselben übergießt man 10 *g* des feinst gepulverten, orange[2]) gefärbten Rohbilirubins mit 75 *cm*³ siedendem absoluten Methylalkohol, leitet getrocknetes Ammoniakgas auf die Suspension und erwärmt vorsichtig auf dem Wasserbade, eventuell unter erneutem Aufleiten von Ammoniak, bis sich das Bilirubin gelöst hat. Dann filtriert man durch einen Heißwassertrichter unter Verwendung eines Kreppfilters (*Dreverhoff*) von 15 *cm* Durchmesser, spült zweimal mit je 15 *cm*³ heißem, mit Ammoniak gesättigten Methylalkohol nach und stellt das Filtrat eine Stunde in eine Kältemischung, wonach es zu einem Kristallbrei erstarrt ist. Dieser wird scharf abgesaugt, mit wenig eiskaltem Methylalkohol nachgewaschen und im Vakuum über Kalk getrocknet. Zur Entfernung hartnäckig anhaftender Spuren von Methylalkohol füllt man den Exsikkator mit trockenem Ammoniakgas, läßt über Nacht stehen und evakuiert von neuem. Die Ausbeute beträgt 6·5 *g*.

Das Filtrat vom auskristallisierten Bilirubinammonium wird in 600 *cm*³ getrockneten Äthers in dünnem Strahl eingegossen, wobei ein hellrot gefärbtes, amorphes Bilirubinammonium ausfällt, das sofort durch eine Extraktionshülse filtriert[3]) und mit Chloroform extrahiert wird, wobei unter Entweichen von Ammoniak Bilirubin in Lösung geht, während geringe Mengen schwefelhaltiger Substanz in der Hülse bleiben.

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 86 (1917).

[2]) Bei der rotbraun gefärbten Bilirubinmodifikation genügt auf 10 *g* Bilirubin ein Zusatz von 50 *cm*³ absoluten Methylalkohols zur völligen Lösung. Die Ausbeuten an kristallisiertem Bilirubinammonium sind weniger gut; bei der Extraktion mit Chloroform wird dann ein hellrot gefärbtes Bilirubin erhalten.

[3]) Aus dem Filtrat läßt sich nach Abdestillation des Äthers und des Methylalkohols noch etwas schön kristallisierendes Bilirubin von roter Farbe gewinnen.

Auch das kristallisierte Bilirubinammonium kann durch Extraktion mit Chloroform in Bilirubin überführt werden; hier bleiben gewöhnlich nur sehr geringe Mengen schwefelhaltiger Stoffe in der Hülse zurück. Auf diesem Wege gelingt also die Abtrennung der letzteren, doch nimmt das Bilirubin durch die Extraktion mit Chloroform wieder Chlor auf, so daß eine zweite Überführung in Bilirubinammonium nötig wird. Der kristallisierte Anteil des letzteren wird dann unter ganz schwachem Erwärmen in vier Teilen Pyridin gelöst, worauf sich beim Stehen reines Bilirubin absetzt, dessen Abscheidung durch Zusatz von Äther vervollständigt wird.

Eigenschaften des Bilirubins.

Das Bilirubin kristallisiert aus Chloroform in monoklinen Tafeln[1]), aus siedendem Dimethylanilin (1:31) in schiefen Säulen von rotbrauner Farbe, aus heißer, verflüssigter Karbolsäure in langgestreckten, feinen, hellgelben Nadeln[2]).

Die Löslichkeit des Bilirubins in Chloroform bei ZT. geht Hand in Hand mit der Farbe; es ist im allgemeinen um so leichter löslich, je dunkler die Farbe ist, doch ist die Löslichkeit niemals eine hohe. Frisch aus Dimethylanilin umkristallisiertes Bilirubin löst sich z. B. 1:120; beim Aufbewahren geht die Löslichkeit zurück. Das mit Hilfe von Pyridin bereitete Bilirubin zeigt eine Löslichkeit von 1:1450 Teilen Chloroform.

Hoch siedende Flüssigkeiten (Benzoë-Salizylsäureester z. B.) lösen beim Siedepunkt Bilirubin etwas reichlicher auf als bei ZT., so daß sich beim Erkalten Ausscheidungen einstellen, doch ist die Löslichkeit zu gering, um ein Umkristallisieren größerer Mengen zu bewirken[3]).

Die Analysen des kristallisierten reinsten Bilirubins weisen auf eine durch die Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4$ wiederzugebende Zusammensetzung hin[4]). Die von *Staedeler*[5]) eingeführte Formel $C_{32}H_{36}O_6N_4$, welche durch den Ausfall sehr vieler Analysen gestützt wird, dürfte trotz derselben daher zu verlassen sein, denn die analytischen

---

[1]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 220 (1911).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 319 (1898); **99**. 130 (1917).

[3]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 308 (1906).

[4]) Auf diese Formel ist zuerst von *H. Fischer* auf Grund der Analysen des Mesobilirubinogens hingewiesen worden. *W. Küster* konnte sie stützen. Zeitschr. f. Biol. **65**. 166 (1914); Zeitschr. f. physiol. Chemie. **82**. 395 (1912); **99**. 86 (1917).

[5]) Von *Staedeler* rührt auch der Name „Bilirubin" her.

Resultate werden durch die Fähigkeit des Bilirubins, Lösungsmittel hartnäckig zurückzuhalten[1]), beeinflußt. Diese Differenzen von den aus der Formel $C_{33} H_{36} O_6 N_4$ berechneten Werten finden sich bei sämtlichen Modifikationen des Bilirubins, so daß nicht die Existenz verschiedener Stoffe anzunehmen ist[2]), sondern Verschiedenheiten, welche durch intramolekulare Umlagerungen ein und desselben Stoffes hervorgehen. Für letztere, von *W. Küster* vertretene Ansicht konnten auch einige chemische Beweise angeführt werden; das frisch aus seinen Salzen hergestellte Bilirubin löst sich z. B. in Natriumbikarbonat auf, im Gegensatz zu anderen Bilirubinpräparaten[3]). Das Vermögen, Ammoniak zu binden, ist bei den verschiedenen Modifikationen sowohl was die Menge des Ammoniaks, als auch was die Festigkeit des Anhaftens betrifft verschieden[4]). Bilirubin hat also saure Eigenschaften, und zwar verhält es sich wie eine zweibasische schwache Säure[5]), so daß vier seiner sechs Sauerstoffatome in Form von Karboxylen vorhanden sind. Dies geht aus der Analyse seiner unlöslichen Salze mit den Erdalkalien hervor[6]), auch läßt sich das Bilirubin durch Diazomethan verestern[7]), wobei zwei Methyle eintreten; allerdings addiert sich daneben das Diazomethan. Die beiden anderen Sauerstoffatome dürften in Form von Hydroxylen vorhanden sein, in anderen Modifikationen als Karbonyl, wofür spricht, daß mit Stanni- und Aluminiumchlorid in indifferenten Lösungsmitteln stark gefärbte, meist dunkelrote Fällungen eintreten, die durch Wasser wieder zerlegt werden. Basische Eigenschaften zeigt das Bilirubin nur in geringem Grade. Mit verdünnten Säuren gibt es keine Salze, leitet man aber in eine abgekühlte Lösung des Bilirubins in Chloroform getrocknetes Chlorwasserstoffgas ein, so schlägt die Farbe der Lösung um, sie wird purpurrot; nach längerem Einleiten stellt sich grüne Fluoreszenz ein und es beginnt sich ein Niederschlag

---

[1]) Ein Gehalt von 0·9% Chlor würde z. B. darauf hinweisen, daß auf 20 Mol. Bilirubin ein Molekül Chloroform vorhanden ist. Die sich für Kohlen-, Wasser- und Stickstoff ergebenden Zahlen stimmen dann mit den aus der Formel $C_{33} H_{36} O_6 N_4$ bezeichneten Werten fast überein.

[2]) *M. Piettre* unterscheidet ein Biliflavin vom Bilirubin. Compt. rend. de l'Acad. de sciences. **148**. 1213; Chem. Zentralbl. **1909**. **2**. 135.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 471 (1912).

[4]) Ibid. **99**. 124/5 (1917).

[5]) 1 *g* Bilirubin ($C_{33} H_{36} O_6 N_4$) würde danach zur Neutralisation 34·2 *cm* $^1/_{10}$ N . KOH verlangen, tatsächlich braucht man 35 *cm*³, um etwa 1% Bilirubin haltende Lösungen zu erhalten, von Natriumkarbonat und Ammoniak braucht man viel mehr als die berechnete Menge.

[6]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 474 (1912); *R. Köster*: Diss. Rostock, *C. Hinstorffs* Buchdruckerei 1901.

[7]) Die Veresterung in saurer oder alkalischer Lösung bewirkt eine Veränderung des Bilirubins, doch enthalten die Produkte auch hier 2 Methyle.

zu bilden, der, abgesaugt und über Kalk getrocknet, ein rotviolettes Pulver mit kantharidenartigem Glanz vorstellt. Es handelt sich um ein Additionsprodukt von Chlorwasserstoff an Bilirubin, aus dem das letztere wieder gewonnen werden kann, dadurch, daß man in warmem Pyridin auflöst, wonach sich beim Erkalten wieder Bilirubin abscheidet. Eine vollständige Abscheidung des Bilirubins wird durch das Einleiten des Chlorwasserstoffes nicht erzielt, was in den Filtraten aber bleibt, enthält bereits stark verändertes Bilirubin[1]).

Komplexe Salze bildet das Bilirubin nicht, im Zusammenhang damit steht, daß ein Stickstoffatom sich in anderer Bindung vorfindet, wie die drei übrigen, da beim Kochen mit Alkalien ein Viertel des Stickstoffes als Ammoniak abgespalten wird. Hier zeigt sich also ein wesentlicher Unterschied gegenüber den unter gleichen Bedingungen beständigen Porphyrinen.

Mit dem Reagens von *Ehrlich* (p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure) gibt Bilirubin keine Färbung, übergießt man aber Bilirubin mit konzentrierter Schwefelsäure und fügt einen Tropfen Formaldehyd hinzu, so tritt intensive Blaufärbung auf.

Die Bildung eines Azofarbstoffes sei durch folgendes Beispiel demonstriert: Die Lösung des Bilirubins in Chloroform wird mit Alkohol unter Vermeidung einer Fällung versetzt und dann mit Salzsäure stark angesäuert. Hiezu fügt man allmählich die alkoholische Lösung von Diazoazetophenon, die man durch Lösen von Aminoazetophenon in Alkohol, Zusatz von Salzsäure und der zur Diazotierung berechneten Menge von Natriumnitrit in wenig Wasser bereitet hat. Der Endpunkt der Reaktion ist daran zu erkennen, daß ein Tropfen der Lösung auf Tüpfelpapier mit Diazoazetophenonlösung keine stärkere Blaufärbung mehr gibt. Dann gießt man in stark mit Salzsäure angesäuertes Wasser, trennt die blau gefärbte Chloroformschicht, welche den Azofarbstoff enthält, ab und wäscht sie chlorfrei, wobei die Farbe in Rot umschlägt. Nach dem Trocknen und Konzentrieren scheiden sich dann beim Stehen im Vakuum mikroskopische, prismenförmige Nädelchen ab, die im auffallenden Licht fuchsinartigen Glanz haben, im durchfallenden schwarz erscheinen. Sie sind löslich in Salz- und Essigsäure, in verdünnter Kalilauge und in Ammoniak, in Chloroform, Alkohol und Amylalkohol, schwer löslich in Wasser, Äther und Schwefelkohlenstoff. Die neutrale Lösung ist rot gefärbt, ebenso die essigsaure, die mineralsaure ist blau, die alkalische grün, die ammoniakalische violettrot. Selektive Absorption ist vorhanden, doch sind die Streifen verwaschen.

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**. 149 (1915).



Aus der Zusammensetzung läßt sich ersehen, daß zur Bildung des Azofarbstoffes ein Molekül Bilirubin mit zwei Molekülen des diazotierten Aminoazetophenons reagiert hat[1]).

Die Bildung eines Azofarbstoffes wird bei der Reaktion von *Ehrlich*[2]) auch zum Nachweis von Bilirubin herangezogen, als Reagens dient hiebei eine 0·1%ige Lösung von Diazobenzolsulfonsäure. Die Ausführung gleicht der soeben beschriebenen; es entsteht bei Anwesenheit von Bilirubin zuerst eine Rotfärbung, die auf Zusatz von konzentrierter Salzsäure durch Violett in ein intensives Blau übergeht. Außer dieser Reaktion benützt man zum Nachweis das unter der Einwirkung von Oxydationsmitteln eintretende Farbenspiel. Man verwendet entweder die betreffenden Lösungen direkt (Harn) oder man isoliert vorher den Gallenfarbstoff (wenn es sich um frische Galle, Mageninhalt, wässerige Auszüge von Geweben oder Fäzes oder um Harn bei Anwesenheit von Blutfarbstoff handelt) durch Zugabe von Kalkmilch unter kräftigem Umschütteln und eventuell, nämlich wenn Blutfarbstoff vorhanden ist, unter Einleiten von Kohlendioxyd. Der entstandene Niederschlag kann als solcher benützt werden oder der Gallenfarbstoff wird zunächst daraus wiedergewonnen. Zu diesem Zweck wird der abfiltrierte, ausgewaschene und unter Alkohol gebrachte Niederschlag nach Zusatz von Chloroform durch Essigsäure zersetzt, die Chloroformschicht durch Zugabe von Wasser zur Abscheidung gebracht, abgelassen und das Lösungsmittel verdunstet, der Rückstand endlich durch Alkohol und Äther gereinigt.

Reaktion nach *Gmelin*[3]). Eine kleine Menge der zu prüfenden wässerigen Lösung wird vorsichtig mit konzentrierter Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthält[4]), unterschichtet. An der Berührungsstelle treten nacheinander Ringe von farbigen Schichten auf, die, von oben nach unten gerechnet, die Reihenfolge von Grün, Blau, Violett, Rot, Rotgelb aufweisen. Charakteristisch ist die Grünfärbung und das Rotviolett, da ohne diese Verwechslung mit Lipochromen möglich ist. Alkohol stört die Reaktion. Empfindlichkeit 1:80.000.

Reaktion von *Huppert-Nakayama*[5]). Man fügt zu dem Kalkniederschlag eisenchloridhaltige alkoholische Salzsäure (99 Teile

---

[1]) *Pröscher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 412 (1900). *Orndorff* und *Teeple* stellten mit Hilfe von diazotiertem Tribromanilin außer dem Diazofarbstoff auch einen Monoazofarbstoff dar. Amer. Chem. Journ. **33**. 215 (1905); Chem. Zentralbl. **1905**. 1. 1254.

[2]) Zentralbl. f. klin. Med. **4**. 721 (1883).

[3]) *F. Tiedemann* und *L. Gautier*: Die Verdauung nach Versuchen. Leipzig und Heidelberg. **1826**. 1. 80.

[4]) *Heintz*: *Poggend.* Ann. **134**. 106.

[5]) Arch. f. Heilk. **8**. 351 und 467 (1867); Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**. 398 (1902).

Alkohol, 1 Teil Salzsäure [1·19], 0·4 Teile Eisenchlorid) und erhitzt zum Sieden, wobei sich eine blaugrüne Farbe einstellt. Nach vorsichtigem Zusatz von rauchender Salpetersäure geht die Farbe in Violett, schließlich in Rot über (Empfindlichkeit 1:100.000). Oxydationsmittel verändern also zunächst in saurer Lösung das Bilirubin sehr leicht; so lassen auch Halogene gefärbte Stoffe entstehen, doch findet durch Brom auch Substitution von Wasserstoff statt[1]). Über die Natur dieser Produkte ist noch wenig bekannt (vgl. Dehydrooxybilirubin, S. 337), doch sei erwähnt, daß unter ihnen solche vorhanden sind [Cholezyanin[2]), Choletelin[2])], die im Gegensatz zum Bilirubin, dessen Lösungen in größter Verdünnung noch eine kontinuierlich vom roten zum violetten Ende des Spektrums fortschreitende Verdunkelung zeigen[3]), selektive Absorption aufweisen. Bilirubin wird aber auch schon durch Säuren allein verändert, so bewirkt Eisessig bei längerer Einwirkung und bei Luftzutritt Grünfärbung, geschmolzene Mono-[4]) und Trichloressigsäure[5]) lösen Bilirubin mit grüner Farbe, Eisessigbromwasserstoff führt Bilirubin allmählich mit dunkelvioletter Farbe in Lösung über, wobei Bromwasserstoff addiert wird; das Reaktionsprodukt verliert dann aber durch Methylalkohol nicht alles Brom, ein Atom verbleibt im Molekül zum Unterschied gegenüber dem Verhalten des Hämins[6]). Chloral und Bromal lösen Bilirubin ebenfalls mit grüner Farbe[7]), auch beim Verdampfen einer Lösung von Bilirubin in Chloroform wird namentlich am Licht ein Teil des roten Farbstoffes in einen grünen verwandelt, der sich in Eisessig löst. Auch bei langer Belichtung schlägt die rotgelbe Farbe einer Chloroformlösung in grün um. Was hier für Veränderungen vorgehen, ist noch nicht bekannt; jedenfalls haben wir es im Bilirubin mit einem sehr labilen Molekül zu tun, und schon beim Aufbewahren im trockenen Zustande tritt eine Umwandlung ein, wie aus der allmählich eintretenden Verfärbung hervorgeht, doch scheint die in Chloroform schwer lösliche Modifikation haltbarer zu sein.

---

[1]) *Thudichum*: Journ. of the chem. Soc. (2.) **13**. 389 (1875); *Maly*: *Liebigs* Ann. **181**. 106 (1876).

[2]) *Jaffé*: Zentralbl. f. d. med. Wiss. **1868**. 241; *Fudakowski*: Ebenda. **1869**. 129; *Stokvis*: Ebenda. **1872**. 784; *Heynsius* und *Campbell*: *Pflügers* Arch. **4**. 520 (1871).

[3]) *Vierordt*: Zeitschr. f. Biol. **10**. 42 und 52 (1874).

[4]) *Maly*: *Liebigs* Ann. **175**. 85 (1875); *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**. 137 bis 151 (1915).

[5]) *M. Piettre*: Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **147**. 1492; Chem. Zentralbl. **1909**. I. 538.

[6]) *W. Küster* und *K. Reihling*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**. 157 (1915).

[7]) *M. Piettre*: Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **147**. 1492; Chem. Zentralbl. **1909**. I. 538.

Eine wäßrig alkalische Lösung des Bilirubins ergrünt an der Luft; Zinkate[1]) beschleunigen die Reaktion, die durch Einlagerung von Wasser und Oxydation bedingt sein dürfte.

B i l i v e r d i n[2]), d. h. ein Gemisch von Stoffen, die nur durch Oxydation entstanden zu sein scheinen (wahrscheinlich handelt es sich um Addition von Wasser und Wegoxydation von Wasserstoff) und bei der Analyse Werte geben, aus denen sich die Formel $C_{33} H_{36} O_8 N_4$ ableiten läßt, bildet sich nur unter Einhaltung folgender Bedingungen:

1 *g* Bilirubin wird in 35 cm^3 n/10-K OH unter Zusatz von 0·5 *l* Wasser zur Lösung gebracht, die Lösung filtriert und das Filtrat in einer großen Schale drei Wochen der Einwirkung des Luftsauerstoffes ausgesetzt, wobei die Temperatur nicht über 5° C steigen darf. Die grün gewordene Lösung wird dann durch einen geringen Überschuß von Salzsäure (es genügen schon 34·5 cm^3 n/10-H Cl, ein kleiner Überschuß bewirkt aber besseres Absitzen des Niederschlages) gefällt, der Niederschlag filtriert, ausgewaschen und noch feucht in einem Überschuß von Alkohol gelöst. Wenn die Oxydation vollständig geworden ist und sich nur „Biliverdin" gebildet hat, wird völlige Lösung erfolgen. Man filtriere, dampfe den größten Teil des Alkohols unter vermindertem Druck ab und gieße den Rückstand in Wasser, wobei das Biliverdin ausfällt (Ausbeute 1 *g*).

Jeder Überschuß an Alkali und jede Temperaturerhöhung bedingt einen anderen Verlauf der Reaktion, sichtbar z. B. daran, daß das saure Filtrat vom Biliverdin deutlich gefärbt ist und Ammoniumsalz enthält. Wirkt ein Überschuß auch nur von Alkalikarbonat bei 10° auf Bilirubin drei Wochen ein, so wird die Ausbeute an grünem Farbstoff vielleicht nur noch 50% vom verwendeten Bilirubin betragen; daneben hat sich ein wasserlöslicher Stoff von brauner Farbe gebildet, der die „Pyrrolreaktion" (beim Erhitzen der Substanz [ohne Zinkstaub] treten Dämpfe auf, die einen mit konzentrierter Salzsäure befeuchteten Fichtenspan intensiv röten) noch ausgesprochener gibt wie Bilirubin. Zu seiner Darstellung macht man das Filtrat vom angeblichen Biliverdin wieder alkalisch, engt es stark ein und fällt nun mit einer Säure aus.

Aufspaltung von Bilirubin durch Oxydation in alkalischer Lösung.

Das Bilirubinmolekül zerfällt also unter dem Einfluß von Alkalien sehr leicht, wobei eine Mitwirkung des Luftsauerstoffes allerdings noch nötig ist. Setzt man daher zu der alkalischen Bili-

[1]) *Stokvis*: Zentralbl. f. d. med. Wiss. **1872.** 784.

[2]) *Heintz*: *Poggend.* Ann. **84.** 117; *Städeler*: *Liebig*s Ann. **132.** 323; *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **59.** 84 (1909).

rubinlösung ein Oxydationsmittel, so tritt die Umwandlung noch rascher ein, und jetzt befinden sich reichliche Mengen von Hämatinsäuren unter den entstehenden Produkten.

10 *g* Rohbilirubin werden z. B. in 200 *g* 5%iger Natronlauge gelöst und 2 *g* Natriumsuperoxyd in die Lösung eingetragen, worauf 60 Stunden im siedenden Wasserbade erwärmt wird. Die Zersetzung des Farbstoffes vollzieht sich hiebei unter Ammoniakentwicklung, dessen Menge etwa einem Atom Stickstoff, auf das Molekül $C_{33}H_{36}O_6N_4$ bezogen, entspricht. Die alkalische Lösung wird nun mit Schwefelsäure angesäuert, wobei reichliche Mengen von Kohlendioxyd entweichen, und die flüchtigen sauren Zersetzungsprodukte, unter denen sich Ameisen- und Essigsäure befinden, mit Wasserdämpfen abgeblasen. Dann kann mit Äther die Rohhämatinsäure entzogen werden, deren Trennung in Anteile die schwerer in Äther löslich sind, z. B. Bernsteinsäure, und in reine Hämatinsäure nach dem auf S. 256 besprochenen Verfahren leicht bewerkstelligt werden kann, doch erhält man nur etwa 2 *g* reine Hämatinsäure $C_8H_8O_5$.

Da die angewandten 2 *g* Natriumsuperoxyd nur zwei Atomen Sauerstoff auf das Molekül $C_{33}H_{36}O_6N_4$ entsprechen, so dürfte die Zersetzung des Bilirubins hauptsächlich durch das Alkali erfolgen[1]). Durch dieses Verhalten unterscheidet sich das Bilirubin scharf vom Hämatin, das in alkalischer Lösung einige Atome Sauerstoff pro Molekül aufzunehmen vermag, ohne eine Zerlegung zu erfahren.

Bessere Ausbeuten an Hämatinsäure, aber auch nur bis zu 30% des verwendeten Bilirubins, erhält man bei der Oxydation in essigsaurer Lösung durch Chromsäure. Hiezu führt man den Gallenfarbstoff zunächst in „Biliverdin" über.

5 *g* Bilirubin werden in 500 *cm*³ 0·14%iger Natronlauge gelöst und die Lösung mit 20 *g* Bleidioxyd eine halbe Stunde geschüttelt, worauf filtriert und das Filtrat mit Essigsäure gefällt wird. Der bleifrei gewaschene, noch feuchte Schlamm wird darauf in 120 *cm*³ Eisessig gelöst, 6·23 *g* Chromtrioxyd in 30 *cm*³ Eisessig gelöst zugegeben (das sind elf Atome Sauerstoff auf das Molekül Bilirubin berechnet), eine viertel Stunde erwärmt und die Essigsäure unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und das Ungelöste mit 20%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade erwärmt, wobei zum größten Teil Lösung erfolgt. Die weitere Verarbeitung geschieht nach den Angaben bei der Oxydation des Hämatins (vgl. S. 254). Die Rohhämatinsäure wird in einer Ausbeute von 1·8 *g* gewonnen, sie besteht fast nur aus $C_8H_8O_5$; entsprechend wird Stickstoff als Ammoniak abgespalten[2]).

---

[1]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**. 89 (1909).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 314 (1898); **59**. 90 (1909).

Bei der Oxydation von Bilirubin in saurer Lösung durch Bleidioxyd entsteht ebenfalls Hämatinsäure[1]), die Oxydation durch Nitrit liefert das Oxim der Phonopyrrolkarbonsäure[2]). Bei der Einwirkung von Natriumnitrit auf in Eisessig suspendiertes Bilirubin erhielt *H. Fischer*[3]) in sehr geringer Menge einen kristallisierten Stoff, der sich sehr leicht zersetzt. Die zunächst bei 87° schmelzende, ätherlösliche Substanz läßt beim Aufbewahren in ein bis zwei Tagen eine neue, in derben Prismen kristallisierende heraussublimieren, die ätherunlöslich ist und sich bei 260 bis 270° langsam zersetzt. Den Chemismus dieser Reaktionen aufzuklären, ist noch nicht gelungen.

Dehydrooxybilirubin und Bilinigrin[4])

sind zwei Stoffe genannt worden, die bei der Einwirkung von Eisenchlorid auf eine Suspension von Bilirubin in Eisessig entstehen. Obwohl sie nicht im reinen Zustand erhalten worden sind, mögen sie ihrer Eigenschaften wegen doch hier erwähnt werden. Aus den Analysen des ersten dieser Stoffe geht nämlich hervor, daß bei der Bildung nicht nur ein Atom Sauerstoff aufgenommen wird, sondern auch zwei Atome Wasserstoff wegoxydiert werden, wobei Farbvertiefung eintritt. Verunreinigt dürfte er durch den Stoff sein, welcher sich aus Bilirubin nur unter dem Einfluß von Eisessig bildet.

Beim „Bilinigrin“ hat sich die Oxydation scheinbar auf die Wegnahme von zwei weiteren Wasserstoff- und auf die Aufnahme von vier Sauerstoffatomen erstreckt.

Es ist nun bemerkenswert, daß das Bilinigrin zunächst in enger Verbindung mit unverändertem Bilirubin und Dehydrooxybilirubin unlöslich in Essigsäure zurückbleibt. Hat man aber ersteres durch Chloroform entzogen, so kann letzteres durch Eisessig entfernt werden, und Bilinigrin bleibt zurück. Dieses Verhalten, also die nähere Vereinigung zweier Stoffe, von denen der eine das Oxydationsprodukt des anderen ist, erinnert an das Entstehen der „Chinhydrone“ und weist darauf hin, daß im Bilirubin zwei Hydroxyle vorhanden sind, die zu Ketogruppen oxydiert werden können[5]).

---

[1]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**. 349 (1911).

[2]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 403 (1912).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. **91**. 192; Zeitschr. f. Biol. **65**. 178 (1914).

[4]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 58 (1914).

[5]) Nach *M. Piettre* erfahren Salze des Bilirubins nicht nur durch Chloranil und Chinon, sondern auch durch Brenzkatechin und Hydrochinon eine Veränderung in dem Sinne, daß tief gefärbte Stoffe entstehen. Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **147**. 1492; Chem. Zentralbl. **1909**. I. 538.

Das Bilinigrin ist endlich deshalb interessant, weil es mit Alkalien unlösliche Salze gibt, und zwar enthalten die mit Karbonaten erhältlichen nur die Hälfte der Alkalimenge, welche den mit Ätzalkalien zu gewinnenden Salzen eigen ist. Beim Schütteln mit einer Silbernitratlösung tritt dann ein Austausch der Alkalien gegen Silber ein[1]). Genau das gleiche Verhalten weist nun das Bilihumin[2]) auf, und es hat also den Anschein, als ob die physiologische Oxydation und Umwandlung der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes, die zunächst zum Bilirubin führt, über dieses Stadium hinausgehen kann und daß dann Stoffe entstehen vom Charakter des Bilinigrins, und die Bildung der Gallensteine könnte demgemäß damit beginnen, daß sich unlösliche Natriumsalze dieser Gallenfarbstoffe bilden und auf diesen einmal gebildeten Kern weitere Ablagerungen erfolgen[3]).

Zur Darstellung des Dehydrooxybilirubins und Bilinigrins suspendiert man 5 *g* Bilirubin in 500 cm^3 Eisessig und trägt in die auf dem Wasserbade erhitzte Suspension 20 cm^3 der offizinellen Eisenchloridlösung ein, setzt das Erhitzen einige Stunden fort, bis der rote Gallenfarbstoff anscheinend verschwunden ist, wobei man häufig schüttelt, filtriert durch ein Kreppfilter und kocht den Rückstand acht- bis zehnmal mit Eisessig aus, bis letzterer fast farblos abläuft.

a) Aus dem Filtrat destilliert man den Eisessig unter vermindertem Druck bis auf ein Zehntel des Volumens ab und gießt den Rückstand in salzsäurehaltiges Wasser, der entstehende Niederschlag wird filtriert, mit verdünnter Salzsäure eisenfrei und dann chlorfrei gewaschen, worauf er nochmals in Eisessig gelöst und auf die beschriebene Weise aus dieser Lösung wieder abgeschieden wird. Die Ausbeute an Dehydrooxybilirubin beträgt etwa 50% des verwendeten Bilirubins. Es stellt ein fast schwarzes Pulver vor, das in siedendem Alkohol mit blaugrüner Farbe etwas, in Eisessig besser löslich ist. Die letztere Lösung wird auf Zusatz von Zinkstaub rot, die alkalische Lösung läßt sich durch Natriumamalgam bis zur Farblosigkeit reduzieren. Die Zusammensetzung entspricht etwa der Formel $C_{33} H_{34} O_7 N_4$.

---

[1]) Auch Bilirubinbarium setzt sich unter gleichen Bedingungen mit einer Kalziumsalzlösung um. (*W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 474 [1912]).

[2]) Ebenda. **59**. 73 (1914).

[3]) Selbstverständlich können auch andere Gründe für die Bildung der Konkremente maßgebend sein. *Salkowski* denkt z. B. an eine primäre Ablagerung von fettsaurem Kalzium. Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 210 (1916).

b) Der mit Eisessig ausgekochte Rückstand wird eisen- und säurefrei gewaschen und nach dem Trocknen mit Chloroform extrahiert, wobei 6 bis 7% des verwendeten Bilirubins zurückerhalten werden. Jetzt kann durch Eisessig wieder Dehydrooxybilirubin weggenommen werden, wonach Bilinigrin zurückbleibt, das in allen Lösungsmitteln unlöslich ist. Beim Kochen mit Natronlauge wird es unter Ammoniakentwicklung zerlegt. Seine Zusammensetzung entspricht etwa der Formel $C_{33} H_{32} O_{10} N_4$.

Die Reduktion des Bilirubins kann in alkalischer Lösung so geleitet werden, daß ganz analog wie bei der Reduktion des Hämins zunächst vier Atome Wasserstoff aufgenommen werden, wobei das noch gefärbte Mesobilirubin entsteht, durch weitere Aufnahme von vier Atomen Wasserstoff bildet sich dann das farblose, äußerst luftempfindliche Mesobilirubinogen. Beide Reduktionsprodukte sind ebensowenig wie das Bilirubin befähigt, komplexe Salze zu geben, erst das an der Luft entstehende Gemenge von Oxydationsprodukten des Mesobilirubinogens, das als „Urobilin" bezeichnet wird, gibt ein komplexes Kupfersalz.

Zur Darstellung des **Mesobilirubins**[1]) werden 5 *g* Bilirubin in 240 *cm*³ n/10-Natronlauge gelöst, die Lösung filtriert und in einer Wasserstoffatmosphäre mit 2 *cm*³ einer 1%igen Lösung von kolloidem Palladium geschüttelt. Wenn kein Wasserstoff mehr absorbiert wird, fügt man noch zweimal je 2 *cm*³ dieser Lösung hinzu. Nach achtstündiger Einwirkung wird der Farbstoff mit Essigsäure gefällt, der voluminöse Niederschlag scharf abgesaugt, ausgewaschen, auf Ton gestrichen und, noch ehe er völlig getrocknet ist, in einer Flasche mit 300 *cm*³ Chloroform eine viertel Stunde geschüttelt. Dann wird vom Ungelösten[2]) filtriert, die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht und der mit Eisessig mehrmals ausgekochte und vom letzteren durch Äther befreite Rückstand aus Chloroform oder Pyridin umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt im besten Fall 2·3 *g*. Das Mesobilirubin $C_{33} H_{40} O_6 N_4$ bildet derbe, schwefelgelbe Prismen aus Chloroform, feine verfilzte Nadeln aus Pyridin kristallisierend, die sich in Essigester lösen, in Eisessig unlöslich sind. Ihr Schmelz- und Zersetzungspunkt liegt bei 315°. Mesobilirubin löst sich nicht in Natriumbikarbonat- oder Sodalösung, in Natronlauge aber leicht; es gibt die *Gmelin*sche Reaktion und läßt sich ebensowenig wie Bilirubin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd durch Salzsäure kondensieren.

---

[1]) *H. Fischer*: Zeitschr. f. Biol. **65**. 172 (1914).

[2]) Durch Extraktion mit Chloroform lassen sich hieraus noch in Prismen kristallisierende Anteile herauslösen, deren Zusammensetzung sich durch die um ein Sauerstoffatom reichere Formel $C_{33} H_{40} O_7 N_4$ am besten wiedergeben läßt. Sie schmelzen bei 320° unter Zersetzung.

Es entsteht auch aus Bilirubin durch Einwirkung von Kaliummethylat bei 100°; während Bilirubin also durch dieses Reagens reduziert wird, läßt sich Mesobilirubinogen durch dasselbe, allerdings erst bei 150°, wieder zu Mesobilirubin oxydieren. Durch Natriumamalgam wird letzteres endlich fast ohne Nebenprodukt zu Mesobilirubinogen reduziert.

Bei der Oxydation des Mesobilirubins, in Eisessig suspendiert, durch Natriumnitrit bildet sich neben Hämatinsäure das Imid der Methyläthylmaleinsäure. Hiedurch wurde bewiesen, daß im Bilirubin ein zweiter Pyrrolkern vorhanden sein muß, während das Entstehen der Hämatinsäure bei der Oxydation des Bilirubins selbst den Beweis für das Vorhandensein eines ersten Pyrrolkernes erbracht hatte.

Bei der Darstellung von **Mesobilirubinogen**[1]) müssen alle Operationen möglichst unter Ausschluß von Luft und Licht vorgenommen werden.

5 *g* Bilirubin werden mit 40 *cm*³ n/10-Lauge und 20 *cm*³ Wasser zwei Minuten geschüttelt, wodurch nur teilweise Lösung erfolgt, und dann 40 *g* zirka 5%iges Natriumamalgam eingetragen, worauf eine Stunde unter Kühlung geschüttelt wird. Die Farbe der nun vorliegenden Lösung ist nur noch schwach gelb, Druck ist nicht vorhanden. Nach Entfernung des Quecksilbers wird mit 50%iger Schwefelsäure eben angesäuert und mit Chloroform viermal ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden mit Natriumsulfat oberflächlich getrocknet, filtriert und in 1 *l* Ligroin (Siedepunkt 50 bis 60°) gegossen, wobei ein rotgelber Niederschlag in beträchtlicher Menge (etwa 2 *g*) ausfällt[2]). Das kaum gefärbte Filtrat hievon wird im Vakuum eingedampft, wobei das rohe Mesobilirubinogen in zu Kugeln vereinigten Gebilden zurückbleibt. Es wird nun erneut in wenig Chloroform gelöst und diese Lösung mit Natriumbikarbonatlösung zehnmal ausgeschüttelt, wodurch ein Teil des Mesobilirubinogens, der als „azide Form" zu bezeichnen ist, entfernt wird. Was im Chloroform gelöst geblieben ist, wird nochmals durch Eingießen in Ligroin gereinigt, wobei wieder eine Fällung entsteht. Das Filtrat hievon hinterläßt beim Verdampfen im Vakuum nahezu reines Mesobilirubinogen als nicht azide Form vom Schmelzpunkt 186 bis

---

[1]) *H. Fischer* und *P. Mayer*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**. 342 (1911).

[2]) Dieser Stoff ähnelt dem Mesobilirubinogen sehr, gibt aber bei der Analyse andere Werte, er schmilzt unter Zersetzung bei 210 bis 215°, nachdem von 175° Sintern eingetreten ist. Sein Entstehen und die bei den ersten Versuchen erhaltene, etwa 50% des verwendeten Bilirubins betragende Menge war Veranlassung, das Mesobilirubinogen als „Hemibilirubin" zu bezeichnen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 222 (1911).

190°, während aus der angesäuerten Bikarbonatlösung die unscharf bei 140 bis 160° schmelzende azide Form durch Chloroform isoliert und mit Hilfe von Ligroin, wie angegeben, gereinigt wird. Beide Formen haben dieselbe Zusammensetzung, aus welcher sich die Formel $C_{33} H_{44} O_6 N_4$ berechnen läßt, beide verhalten sich wie zweibasische Säuren, wenn sie in alkoholischer Lösung mit Phenolphthalein als Indikator titriert werden[1]), beide haben dasselbe Molekulargewicht, das mit der einfachen Größe obiger Formel harmoniert[2]). Es handelt sich also um desmotrope Formen, die in der Chloroformlösung in einem bestimmten Gleichgewicht stehen. Ein solches stellt sich auch ein, wenn die azide Form in Bikarbonat gelöst worden ist, da sich dieser Lösung 8% nicht azide Form entziehen lassen.

Das Mesobilirubinogen kristallisiert in derben, monoklinen Prismen, ist sehr schwer löslich in Essigester, Äther, Benzol, Ligroin und Wasser, leicht in Alkohol, Chloroform und Naphthalin, auch in Alkalien und in konzentrierter Salzsäure.

Mit Diazoniumsalzen bildet es Farbstoffe, die Fichtenspanreaktion, wie die mit p-Dimethylaminobenzaldehyd ist stark positiv. In Schwefelsäure gelöst, gibt es unter der Einwirkung von salpeteriger Säure das Oxim der Phonopyrrolkarbonsäure, die Oxydation mit Chromsäure, und die mit Bleidioxyd gibt Hämatinsäure und das Imid der Methyläthylmaleinsäure.

An der Luft wandelt sich das Mesobilirubinogen mit großer Geschwindigkeit in einen zunächst rotorange gefärbten Stoff um, der in Essigester und in Bikarbonat leicht löslich ist und das Urobilinspektrum gibt. Weiterhin bildet sich ein brauner Farbstoff mit grünem Oberflächenschimmer, der alle Urobilinreaktionen aufs intensivste gibt. Das Mesobilirubinogen hat sich dann auch als identisch erwiesen mit der Muttersubstanz des im Harn beim Stehen an der Luft auftretenden Urobilins, also mit dem U r o b i l i n o g e n. Dieses läßt sich aus einem Harn, der die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion ausgeprägt zeigt, auf folgendem Wege isolieren: Man beschickt eine 20 *l* haltende Flasche, die 500 *cm*³ Chloroform enthält, allmählich mit dem täglich im Krankenhaus abgeholten pathologischen Urin, der nicht zersetzt oder in Gärung begriffen sein darf. Sobald die Flasche nahezu gefüllt ist, wird mit Eisessig bis zur

---

[1]) Mit Hilfe des Spektroskops, bis der Streifen im Rot (605 bis 578) des alkalischen Phenolphthaleins erscheint bezw. verschwindet.

[2]) Hieraus folgt auch, daß dem Bilirubin selbst das dem Einfachen der Formel $C_{33} H_{36} O_6 N_4$ entsprechende Molekulargewicht zukommen muß, eine direkte Bestimmung hat wegen der Schwerlöslichkeit noch nicht erfolgen können.

stark sauren Reaktion gegen Lackmus angesäuert, gut durchgeschüttelt und die Schichten durch Abheben, zum Schluß im Scheidetrichter getrennt. Die Ausschüttelung mit Chloroform wird wiederholt. Die vereinigten Chloroformextrakte, die völlig emulsionsfrei sein müssen[1]), werden zusammen mit einem zweiten Extrakt aus wiederum 20 *l* Urin vereinigt und dann dreimal mit je 100, 50 und 50 cm^3 1%igem Ammoniak unter Vermeidung von Emulsionsbildung extrahiert. Die ammoniakalische Lösung wird dreimal mit Äther ausgeschüttelt, dann mit 50%iger Schwefelsäure eben kongosauer gemacht und nun wieder mit Chloroform extrahiert. Der Auszug wird mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 25° zur Trockne gebracht, der Rückstand in 3 bis 4 cm^3 Essigester gelöst und die Lösung filtriert. Beim langsamen Verdunsten kristallisiert dann Urobilinogen heraus, es wird nach dem Absaugen und Abwaschen mit Essigester in einer Ausbeute von 0·02 *g* gewonnen und erweist sich durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt als identisch mit Mesobilirubinogen. Zum Nachweis kann man am besten die *Ehrlich*sche Reaktion anwenden, da der beim Versetzen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure beim nachträglichen Erhitzen entstandene rote Stoff einen charakteristischen breiten Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E* im Orange aufweist[2]).

Da sich nun das Mesobilirubinogen an der Luft leicht verändert, wird im Harn neben diesem Leukofarbstoff auch das „Urobilin" genannte Gemisch seiner Oxydationsprodukte auftreten. Man kann es direkt im Harn nachweisen oder nach voraufgegangener Isolierung.

1. Nach *W. Schlesinger*[3]) setzt man zum Harn das gleiche Volumen einer 10%igen absolut alkoholischen Zinkazetatlösung und filtriert. Das Auftreten einer rotgrünen Fluoreszenz zeigt Urobilin an; mit einer Konvexlinse läßt sich die leichteste Fluoreszenz beobachten.

---

[1]) Emulsionen können meist durch wiederholtes Absaugen beseitigt werden, oft muß aber die Emulsion durch Schütteln mit Talkum und nachfolgende Filtration zerlegt werden. Ein in jedem Fall anwendbares Verfahren kann nicht angegeben werden, da die Verhältnisse je nach dem gerade vorliegenden Harn stark schwanken. Aufs strengste ist aber immer darauf zu achten, daß nicht die geringsten Teile der Emulsion in das zur weiteren Verarbeitung kommende Extrakt gelangen, da sonst die ganze Arbeit vereitelt wird. (*H. Fischer*: und *Fr. Meyer-Betz*: Zeitschr. f. physiol. Chem **75**. 248 [1911].)

[2]) *O Neubauer*: Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München. Juli 1903; *W. Hildebrandt*: Zeitschr. f. klin. Med. **59**. 351 (1905).

[3]) Deutsche med. Wochenschr. **1903**. 561.

2. Nach *Nencki* und *Rotschy*[1]) extrahiert man 50 *cm*³ mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuerten Harnes mit 25 *cm*³ Amylalkohol unter gelindem Durchmengen, filtriert und prüft die abgetrennte amylalkoholische Schicht spektroskopisch und auf Fluoreszenz nach Zusatz einer alkoholischen Zinkchloridlösung.

Aus saurer Lösung in Alkohol oder Chloroform überführt, zeigt das „Urobilin" einen breiten Streifen zwischen *E* und *F*, der, bei starker Konzentration etwas über *F* hinausreichend, gleichmäßig in die Verdunkelung Violett übergeht. Macht man die Lösung alkalisch, so verschwindet der genannte Streifen, nach Zusatz von Chlorzink tritt dann ein einziger breiter Streifen ziemlich in der Mitte zwischen *E* und *F*, näher dem Rot zu gelegen, auf, ohne Verdunkelung im Violett.

3. Nach *H. Fischer*[2]) wird 1 *l* pathologischen Urins mit zirka 50 *cm*³ Chloroform kräftig durchgeschüttelt und die entstehende Emulsion durch zirka zehn Minuten langes Stehen absitzen gelassen. Hienach läßt man sie in einen kleinen Schütteltrichter und dekantiert, falls sich während weiterer zehn Minuten nochmals Urin auf der Oberfläche abgeschieden hat, diesen ab. Dann zerstört man die Emulsion durch Zugabe von zwei bis drei Messerspitzen Talkum und heftiges Schütteln, eventuell muß noch etwas Chloroform hinzugegeben werden. Das Chloroformextrakt wird nun durch ein mit Chloroform angefeuchtetes Filter in einem kleinen Schütteltrichter filtriert, mit 3 bis 5 *cm*³ n/10-Natronlauge ausgeschüttelt und die alkalische Lösung, von der ein Tropfen die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion und ebenso die Fluoreszenzprobe mit Zinkazetat intensiv geben muß, durch ein mit Wasser angefeuchtetes Filter in ein Reagenzrohr filtriert und mit ein bis zwei Tropfen einer 10%igen Kupfersulfatlösung versetzt. Nach Zugabe von acht bis zehn Tropfen 33%iger Natronlauge entsteht eine hellila Färbung, die sichtlich nachdunkelt und nach spätestens zwei Minuten (bei Sonnenschein fast momentan) einen charakteristischen spektroskopischen Befund zeigt: Streifen im Rot, Gelb und Blau. Noch deutlicher zeigt diesen die Chloroformlösung, welche man dadurch erhält, daß man die alkalische Lösung mit Essigsäure ansäuert und mit 3 bis 4 *cm*³ Chloroform extrahiert, welches Lösungsmittel das komplexe Kupfersalz des Urobilins aufnimmt.

Auch in den Fäzes findet sich Urobilin. Man extrahiert sie durch Zerreiben mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, engt das Extrakt bei 40 bis 50° ein und nimmt mit Ätheralkohol (1 : 2 Vol.) in der Wärme auf, setzt Chloroform hinzu und wäscht den Alkohol fort. Dem Chloroform entzieht man das Urobilin durch verdünntes

---

[1]) Monatsh. f. Chem. **10**. 568 (1889).

[2]) Münch. med. Wochenschr. Nr. 47 (1912).

Ammoniak und führt es aus dieser Lösung nach dem Ansäuern wieder in Chloroform über.

* * *

Während die Aufspaltung des Bilirubins durch oxydierend wirkende Mittel in saurer wie in alkalischer Lösung sehr leicht gelingt, wobei allerdings eine Reihe von Stoffen auftritt, so daß die Isolierung der einzelnen schwierig ist und die Ausbeuten an ihnen zu wünschen übrig lassen, schließlich aber dieselben Stoffe entstehen wie bei der Oxydation des Hämatins, führt die

reduktive Aufspaltung des Bilirubins

insofern zu einem bemerkenswerten Ergebnis, als hier ein wesentlicher Unterschied gegenüber dem Hämatin zu verzeichnen ist.

Die totale Aufspaltung durch Eisessigjodwasserstoff ist nur schwierig zu erreichen, viel schwieriger als beim Hämin, es findet vielmehr beim Bilirubin eine Aufspaltung statt, die zu einem zweikernigen Pyrrolderivat $C_{17} H_{24} O_8 N_2$ führt, das den Namen Bilirubinsäure erhalten hat. Ihre Konstitution konnte dadurch einwandfrei festgestellt werden, daß sie bei der Oxydation zunächst unter Verlust von zwei Wasserstoffatomen in eine gefärbte Substanz, die Xanthobilirubinsäure, übergeht, um dann in Hämatinsäure und das Imid der Methyläthylmaleinsäure zu zerfallen. Die Bilirubinsäure ist von *H. Fischer*[1]) und *O. Piloty*[2]) fast gleichzeitig erhalten worden; ihr gefärbtes Oxydationsprodukt wurde zuerst von *Piloty* und *Thannhauser*[3]) durch Einwirkung von Kaliumpermanganat dargestellt, später von *H. Fischer*[4]) gewonnen, als er Kaliummethylat bei 170 bis 190° auf Bilirubinsäure und auf Mesobilirubinogen einwirken ließ. In beiden Fällen wirkt das Reagens also oxydierend, der letztgenannte Stoff erfährt auch eine Aufspaltung. Nun zersetzt sich die von *Piloty* erhaltene „Xanthobilirubinsäure“ über 260° erhitzt, ohne zu schmelzen, die von *H. Fischer* aus Bilirubinsäure gewonnene Xanthosäure schmilzt bei 285°, ihr Ester bei 212°, die aus dem Mesobilirubinogen hervorgehende aber bei 294°, ihr Ester bei 190°. Danach könnte also an das Bestehen isomerer Xanthosäuren gedacht werden, wie es die folgende Formulierung denn auch zuläßt, die auch dem Befunde Rechnung trägt, daß bei der Reduktion dieselbe Bilirubinsäure wieder entsteht.

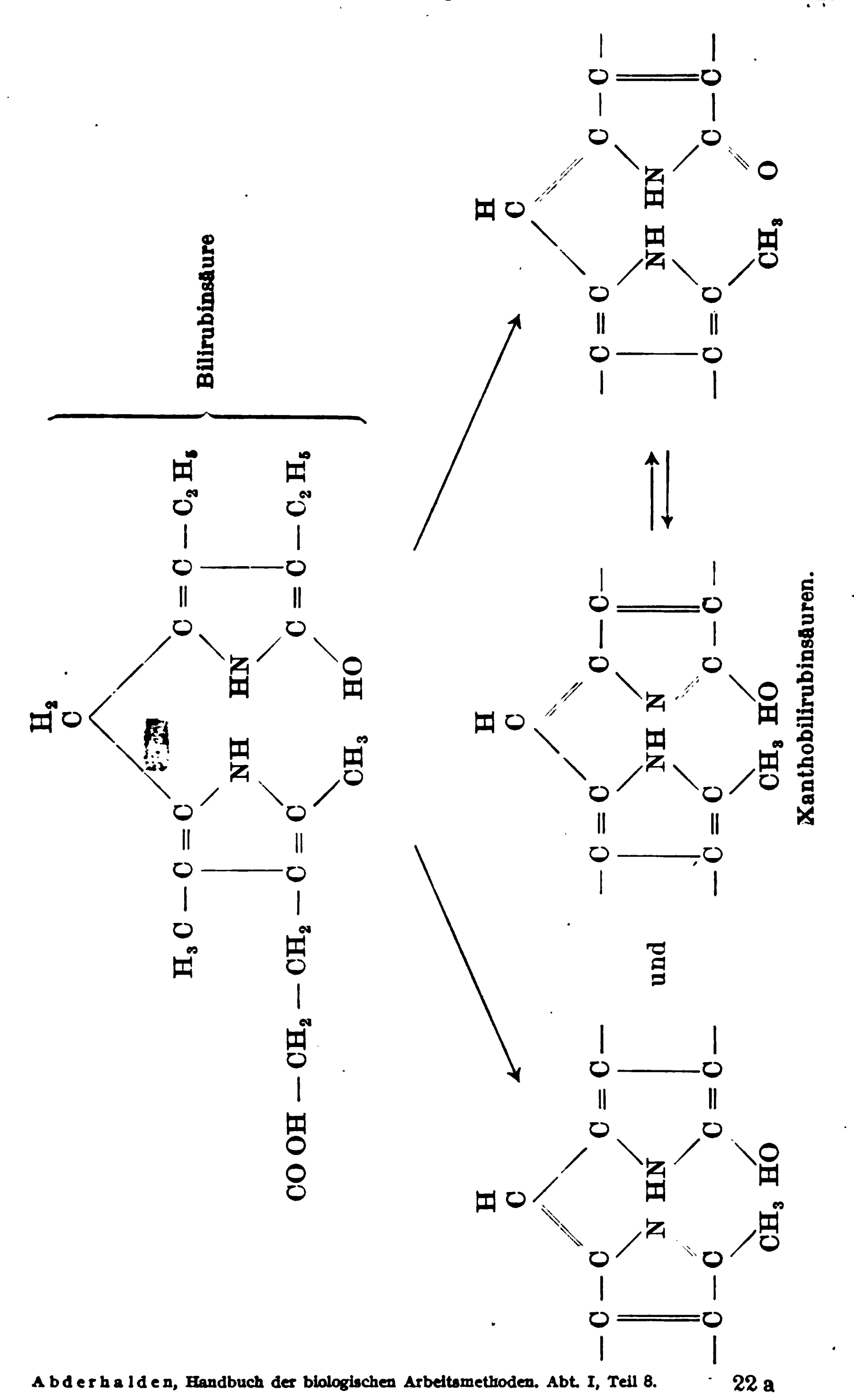
---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45.** 1579 (1912).

[2]) *Liebigs* Ann. d. Chem. **390.** 191 (1912); *Piloty* nannte sie „Bilinsäure“.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45.** 2393 (1912).

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46.** 439 (1913).


Bilirubinsäure
und
Xanthobilirubinsäuren.

Die Bilirubinsäure liefert nun bei sehr energischer Reduktion neben wenig Phonopyrrolkarbonsäure die Isophonopyrrolkarbonsäure und dann sehr geringe Mengen von Kryptopyrrol[1]). Und gerade diese Beobachtung, wonach also die basischen Spaltprodukte nur in minimaler Ausbeute entstehen, steht wiederum mit der Annahme der soeben entwickelten Konstitutionsformel in Übereinstimmung, in welcher der basische Pyrrolkern ein Hydroxyl trägt. Denn ein solches, von *Benary*[2]) hergestelltes Pyrrol zeigte unter gleichen Bedingungen dasselbe Verhalten. Damit ist für das sechste Sauerstoffatom des Bilirubins die Form des Hydroxyls sichergestellt, vier Atome sind ja in Form zweier Karboxyle vorhanden, für das fünfte wurde die Form des Hydroxyls wahrscheinlich gemacht dadurch, daß sich durch die Einwirkung von Alkali in Verbindung mit der des Luftsauerstoffes Hämatinsäure aus dem Bilirubinmolekül bildet, woraus gefolgert wurde, daß der hier umgewandelte Pyrrolkern schon von vornherein Sauerstoff enthalten muß[3]).

Bei der Aufspaltung der Bilirubinsäure mit Kaliummethylat entsteht Trimethylpyrrolpropionsäure, aber kein Phyllopyrrol; da nun Bilirubin unter gleichen Bedingungen auch letzteres liefert, muß im Bilirubin ein dritter Pyrrolkern vorhanden sein, basischer Art, aber ohne Hydroxyl. Auf die Anwesenheit eines vierten Pyrrolkernes im Bilirubin schließt *H. Fischer*[4]) endlich aus der Beobachtung, wonach Natriummethylat aus Bilirubinsäure nur die Xanthobilirubinsäure entstehen läßt, während unter gleichen Bedingungen aus Bilirubin neben der Xanthosäure auch Trimethylpyrrolpropionsäure entsteht. Für die Konstitution des Bilirubins läßt sich also mit einiger Sicherheit ableiten, daß zwar die vier substituierten Pyrrolkerne des Hämins in ihm noch vorhanden sind, daß aber zwei von ihnen durch Wassereinlagerung von den verbindenden Methinen losgelöst worden sind, so daß das Hydroxyl jedesmal an den Pyrrolkern tritt. Vielleicht sind auch nur noch drei Methingruppen vorhanden, da ja Bilirubin ein Kohlenstoffatom weniger enthält als Hämin. Sicher ist ferner, daß sich die Stickstoffatome im Bilirubin in anderer Bindung befinden wie im Hämin, wie aus der Unfähigkeit zur Komplexsalzbildung gefolgert werden muß.

---

[1]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 3274 (1912); **46**. 439 (1913); Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**. 255 und 268 (1914).

[2]) Es handelt sich um den 2-Methyl-4-oxypyrrol-3-karbonsäureester. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 1363 (1913); Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**. 266 (1914).

[3]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**. 138 und 139 (1915). Eine etwas andere Auffassung wird später vertreten. Ibid. **99**. 96 (1917).

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 439 (1913).

Einen klaren Einblick in die Konstitution des Bilirubins und damit in die Vorgänge, welche vom Hämatin zum Bilirubin führen, gestatten aber die bisher erübrigten Resultate der Untersuchungen über das Bilirubin noch nicht.

Zur Darstellung der Bilirubinsäure[1])

werden 50 *g* Bilirubin mit 835 *cm*³ Eisessig und 415 *cm*³ Jodwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·96) übergossen und im siedenden Wasserbade unter häufigem Umschütteln etwa dreiviertel Stunden erhitzt. Nach dieser Zeit wird das freigewordene Jod mit zirka 35 *g* Jodphosphonium reduziert, wonach die Säuren unter vermindertem Druck aus dem siedenden Wasserbade abdestilliert werden. Der Rückstand wird mit wenig Wasser digeriert, wobei er langsam in Lösung geht; hierauf setzt man so viel Wasser hinzu, bis auf weiteren Zusatz keine Fällung mehr entsteht, und gießt von dieser ab. Die Lösung wird mit Natronlauge versetzt, bis die Kongoreaktion eben noch angedeutet ist, und dann erschöpfend mit Äther extrahiert. Die Fällung wird in Soda gelöst, die Lösung mit Schwefelsäure angesäuert, filtriert und das Filtrat ebenfalls ausgeäthert. Aus den konzentrierten Ätherextrakten kristallisieren dann 7·7 *g* fast reine Bilirubinsäure heraus. In den Mutterlaugen ist sowohl Phono- wie Isophonopyrrolkarbonsäure vorhanden, die nach dem S. 277 beschriebenen Verfahren getrennt werden können. Es wird also auch die zweite Hälfte des Bilirubinmoleküls allem Anschein nach wenigstens teilweise aufgespalten, und so bildet sich auch ein Pyrrol, namentlich wenn kleinere Mengen von Bilirubin in Arbeit genommen werden[2]).

Zur Reinigung wird die Bilirubinsäure aus verdünntem Methylalkohol umkristallisiert, man erhält sie dann in zu Büscheln vereinigten, großen Blättchen, die bei 187° schmelzen. Sie treibt aus Soda Kohlensäure aus, löst sich leicht in Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform und Eisessig, schwer in Essigester und ist in Petroläther und Benzol so gut wie unlöslich. Die Aldehydreaktion nach *Ehrlich* gibt sie nicht, erweist sich also hiedurch als vollständig substituiertes Pyrrolderivat.

Darstellung der Xanthobilirubinsäure.

1. 1·5 *g* Bilirubinsäure werden in 50 *cm*³ n/10-Natronlauge gelöst und in die durch Eiskühlung unter + 7° gehaltene Lösung tropfenweise 200 *cm*³ n/10-Kaliumpermanganatlösung eingetragen.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 397; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 1581; **47**. 794.

[2]) Die Abtrennung desselben kann durch Auskuppeln mit Diazobenzolsulfonsäure erreicht werden. Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**. 397 und 398 (1912).

Sobald der Manganschlamm sich abgesetzt hat, wird filtriert und das hellbraune Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, wobei ein amorpher gelbbrauner Niederschlag auftritt, der nach dem Trocknen aus wenig absolutem Alkohol umkristallisiert wird. So wird die Xanthobilirubinsäure in Form zitronengelber, schlanker, abgeschrägter Prismen erhalten, welche Neigung zur Zwillingsbildung haben. Die Ausbeute beträgt 0·3 *g*. Sie zersetzt sich ohne zu schmelzen bei über 260°, ist unlöslich in Wasser, Petroläther, Benzol, ziemlich leicht löslich in heißem absoluten Alkohol und in Eisessig. Sie gibt keine Pyrrolreaktion und reagiert nicht mit p-Dimethylaminobenzaldehyd.

Sehr charakteristisch ist die Schwerlöslichkeit des Natriumsalzes. Die Säure löst sich in verdünnter Natronlauge oder in Sodalösung beim Erwärmen auf, beim Erkalten scheidet sich das Natriumsalz als pikratgelber, kristallisierter Niederschlag aus, der aus 70%igem heißen Alkohol umkristallisiert werden kann, wobei er in schlanken, konzentrisch gruppierten Nadeln erhalten wird[1]).

2. 2 *g* Bilirubinsäure werden mit 2 *g* Natrium und 30 cm^3 Methylalkohol im Einschmelzrohr drei Stunden auf 150° erhitzt. Nach dem Erkalten wird der Röhreninhalt durch Abdampfen im Vakuum vom Methylalkohol befreit, der Rückstand in Wasser aufgenommen und die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure eben kongosauer gemacht, wobei sich bräunliche Flocken ausscheiden, die abgesaugt und getrocknet werden. Nachdem in erheblicher Menge vorhandene Verunreinigungen durch Verreiben mit Äther beseitigt worden sind, wird der Rückstand aus Alkohol umkristallisiert, wobei gelbe Prismen mit dem Schmelzpunkt 285° erhalten werden[2]). Der durch Methylalkohol und Salzsäure erhaltene Ester schmilzt bei 212°. Denselben Schmelzpunkt wies der Ester einer Xanthobilirubinsäure auf, der sich durch Oxydation während der Destillation des Bilirubinsäureesters gebildet hatte[3]).

3. 5 *g* Mesobilirubinogen werden drei Stunden lang mit 50 cm^3 10%iger Kaliummethylatlösung auf 190° im Rohr erhitzt. Nach dem Erkalten wird der Röhreninhalt herausgespült, mit Wasser verdünnt und bei Gegenwart von Äther mit Eisessig angesäuert, wobei ein hellgelber Niederschlag entsteht, der ein Gemisch von Xanthobilirubinsäure mit Mesobilirubin vorstellt. Er wird mit viel Äther ausgewaschen und dann mehrere Stunden mit Chloroform extrahiert, wonach — beim Stehen über Nacht — Xanthobilirubin-

---

1) *Piloty* und *Thannhauser*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 2393 (1912).

2) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**. 440 (1913); Zeitschr. f. Biol. **65**. 174 (1914).

3) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**. 795 (1914).

säure in derben Prismen auskristallisiert (Ausbeute 0·4 *g*). Der Schmelzpunkt dieser Säure liegt bei 294°, der ihres Esters bei 190°[1]).

Die Aufspaltung des Bilirubins zu Kryptopyrrol und Isophonopyrrolkarbonsäure

wird auf folgendem Wege erreicht[2]):

25 *g* Bilirubin werden in einem Gemisch von 450 *cm*³ Eisessig und 170 *cm*³ Jodwasserstoff (spezifisches Gewicht 1·96) etwa 15 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, wonach das ausgeschiedene Jod mit zirka 20 *g* Phosphoniumjodid reduziert und das Säuregemisch im Vakuum abdestilliert wird. Der Rückstand wird in Soda aufgenommen, wobei sich ein schwacher Geruch nach Sellerie bemerkbar macht, und durch Dampfdestillation ein Öl in einer Ausbeute von zirka 1 *g* erhalten, das nach seiner Überführung in Äther durch Versetzen der konzentrierten ätherischen Lösung mit feuchtätherischer 10%iger Pikrinsäurelösung als in feinen Nadeln kristallisiertes Pikrat gefällt wird. Der Schmelzpunkt 136 bis 137° erweist es als Kryptopyrrolpikrat (vgl. S. 274). Vielleicht entsteht auch Hämopyrrol, Phyllopyrrol dagegen nicht. Die sodaalkalische Mutterlauge wird schwach kongosauer gemacht, durch Äther erschöpfend extrahiert und die ätherische Lösung im Vakuum eingedampft, wobei ein öliger Rückstand im Betrage von 13 *g* zurückbleibt. Er wird in 110 *cm*³ 10%iger ätherischer Pikrinsäurelösung gelöst; beim Stehen in Eis kristallisieren dann 7·6 *g* des Pikrates der Isophonopyrrolkarbonsäure, das, aus Alkohol umkristallisiert, den Schmelzpunkt 152 bis 153° aufweist (vgl. S. 279).

Die Aufspaltung des Bilirubins durch Kaliummethylat[3])

wird in einem versilberten Kupfertiegel im Autoklaven vorgenommen, und zwar besteht die Beschickung aus 50 *g* Kalium, die in 200 *g* absolutem Methylalkohol gelöst werden, und 25 *g* feinst gepulvertem Bilirubin. Sie wird fünf Stunden bei 218 bis 225° gehalten, nachdem zwei Stunden zur Erreichung dieser Temperatur nötig waren, wobei das Ölbad 280° zeigt. Der Druck steigt bis auf 52 und beträgt nach dem Erkalten noch neun Atmosphären. Dann wird der stark nach Ammoniak riechende Inhalt der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei ein Pyrrol übergeht, das nun dem Destillat durch Äther entzogen wird. Nach dem Verdampfen des Äthers wird der

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. **65**. 170 bis 173 (1914).

[2]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**. 3277 (1912); Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**. 267 (1914).

[3]) *H. Fischer* und *H. Röse*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**. 269 (1914).

bereits kristallisierende Rückstand im Vakuum bei 160° Ölbadtemperatur destilliert und das Übergehende, ein Öl, das bald in den für Phyllopyrrol charakteristischen rechteckigen Platten erstarrt, mit 10 cm^3 10%iger ätherischer Pikrinsäurelösung in das Pikrat überführt. Der Schmelzpunkt desselben liegt bei 104 bis 105° (vgl. S. 275), die Ausbeute beträgt 0·8 *g*.

Die bei der Wasserdampfdestillation zurückbleibende alkalische Flüssigkeit wird schwach angesäuert und ausgeäthert. Der Rückstand dieser ätherischen Lösung ist sirupös; er wird mit siedendem Wasser behandelt, die Lösung filtriert und das Filtrat wieder ausgeäthert. Nun hinterläßt der Äther 5·8 *g* eines Sirups, aus dem durch Aufnahme in 50 cm^3 10%iger ätherischer Pikrinsäurelösung ein Pikrat dargestellt werden kann. Es scheidet sich beim Stehen der Lösung in Eis im Betrage von 3 *g* ab und schmilzt bei 125 bis 126° wonach es sich mit dem Pikrat der Trimethylpyrrolpropionsäure als identisch erweist (vgl. S. 283).

Lieferung 39

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

Unter Mitarbeit von über 400 bedeutenden Fachmännern herausgegeben von
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Emil Abderhalden
Direktor des Physiologischen Institutes der Universität Halle a. d. Saale

Abt. I, Chemische Methoden, Teil 8, Heft 3

Zusammengesetzte Eiweißkörper. Proteide. Blutfarbstoffe und ihre Spaltprodukte. Einfache Eiweißstoffe. Proteine

O. Schumm-Hamburg:

Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum, in der Leber, Niere und anderen Organen und in Knochen

Bildung, Vorkommen und Merkmale des Hämatins, dessen Nachweis und Bestimmung im Blutserum

Thomas B. Osborne-New-Haven
und E. Strauss-Frankfurt a. M.:

Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt

Fr. N. Schulz-Jena:

Darstellung von kristallisiertem Eiweiß

Franz Samuely †
und Eduard Strauss-Frankfurt a. M.:

Eigentliche Proteine

Eduard Strauss-Frankfurt a. M.:

Proteinoide

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 B

Urban & Schwarzenberg
1921

Wien I
Mahlerstraße 4

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Bisher liegen vor:

Einführung von **Emil Abderhalden.** Nebst einer vollständigen und ausführlichen Inhaltsübersicht de 13 Abteilungen des Werkes . . . . M 2.—

Lfg. 1 (Abt. I, Teil 9): **Schmidt** und **Grafe,** Alkaloide . . . . M 60.—

Lfg. 2 (Abt. III, A.): **v. Sanden,** Praktische Mathematik. — **Eichwald,** Mathematische Behandlun der chemischen Kinetik . . . . M 15.—

Lfg. 3 (Abt. V, Teil 6): **Koeppe,** Die biophysikalischen Untersuchungsmethoden der normalen un pathologischen Histologie des lebenden Auges . . . . M 20.—

Lfg. 4 (Abt. VI, A.): **Wirth,** Spezielle psychophysische Maßmethoden . . . . M 36.—

Lfg. 5 (Abt. XIII, Teil 1): **Schürmann,** Methoden der Immunisierung. Antisera. Technik de Gewinnung, Auswertung und Anwendung . . . . M 20.—

Lfg. 6 (Abt. I, Teil 1): **Krämer** und **Schrader,** Darstellung der wichtigsten anorganischen un organischen Reagentien . . . . M 17.—

Lfg. 7 (Abt. III, B.): **Bachmann,** Methoden zur Erforschung der feineren Struktur von Gelen un Gallerten. — **Liesegang,** Spezielle Methoden der Diffusion in Gallerten . . . . M 15.—

Lfg. 8 (Abt. VI, A.): **Kirschmann,** Grundzüge der psychologischen Maßmethoden . . M 14.—

Lfg. 9 (Abt. I, Teil 4): **Spinner,** Kohlenwasserstoffe. Allgem. Methoden zu ihrem Nachweis. Di wichtigsten Methoden ihrer Darstellung. Qualitativer und quantitativer Nachweis der einzelne biologisch wichtigen Kohlenwasserstoffe. Ihre Isolierung . . . . M 7.—

Lfg. 10 (Abt. IV, Teil 10): **Müller,** Methodik der biologischen Gasanalyse. — **Krogh,** Mikro gasanalyse. — **Straub,** Technik der Blutgasanalyse nach Barcroft. — **Müller,** Quantitativ Bestimmung des Gasstoffwechsels mittels des Zuntz-Geppertschen Apparates . M 36.—

Lfg. 11 (Abt. I, Teil 4): **Eichwald** und **Weil,** Alkohole, Ketone, Aldehyde, Oxyketone, Oxy aldehyde, Phenol- und Methoxylgruppe . . . . M 42.—

Lfg. 12 (Abt. V, Teil 7): **Budde,** Mathematische Theorie der Gehörsempfindung . . . M 30.—

Lfg. 13 (Abt. XI, Teil 2): **Grafe,** Die physikalisch-chemische Analyse der Pflanzenzelle Permeabilitätsbestimmung bei Pflanzenzellen. Anwendung von Adsorption und Kapillaritä zur biochemischen Analyse. Messung der Gas- und Wasserbewegungsvorgänge im Pflanzen organismus . . . . M 27.—

Lfg. 14 (Abt. I, Teil 8): **Steudel, Thannhauser** und **Winterstein,** Nukleoproteide, Nukleinsäure und ihre Abbaustufen . . . . M 27.—

Lfg. 15 (Abt. I, Teil 3): **Biehringer,** Die wichtigsten stöchiometrischen Berechnungen. — **Emich,** Methoden der Mikrochemie. . . . . M 48.—

Lfg. 16 (Abt. I, Teil 3): **Lieb,** Die Mikroelementaranalyse mit Einschluß der Halogenbestimmun nach Fritz Pregl. — **Dubsky,** Halb-Mikroelementaranalyse nach J. V. Dubsky. — **Fodor** Die Mikro- und Makrokjeldahl-Stickstoffbestimmung. — **Simonis,** Makroelementaranalyse mi Einschluß der Halogenbestimmung. — **Dennstedt,** Die vereinfachte Elementaranalyse. — **Oelsner,** Methodik der Gesamtstickstoffbestimmung in Gegenwart von Nitrat und Nitrit M 27.—

Lfg. 17 (Abt. V, Teil 2): **Unna,** Chromolyse Sauerstofforte und Reduktionsorte. . . . M 12.—

Lfg. 18 (Abt. V, Teil 3): **Spemann,** Mikrochirurgische Operationstechnik. — **Barfurth,** Erforschun der Regeneration bei Tieren. — **Przibram,** Studium des Einflusses der Wärme, des Lichtes der Elektrizität, der Schwerkraft und Zentrifugalkraft auf die Entwicklung. — **Herbst,** Di chemischen und physikalischen Methoden auf dem Gebiete der Entwicklungsmechanik. — **Neumayer,** Technik der experimentellen Embryologie. . . . . M 33.—

Lfg. 19 (Abt. XIII, Teil 2): **Pfeiffer,** Die Arbeitsmethoden bei Versuchen über Anaphylaxie. — **Dold,** Die Präzipitine und die Methoden der Präzipitation. — **Messerschmidt,** Di Agglutination (einschließlich der Paragglutine). Die Opsonine. . . . . . . M 36.—

Lfg. 20 (Abt. I, Teil 10): **Fonrobert, Harries, Grafe** und **Brieger,** Kautschuk und Flechtenstoffe M 60.—

Lfg. 21 (Abt. V, Teil 2): **Vonwiller,** Intravitale Färbung von Protozoen. — **v. Möllendorf,** Vital Färbungen der Tierzellen . . . . M 9.—

Lfg. 22 (Abt. VI, Teil C.): **Wobbermin,** Religion . . . . M 7.50

Lfg. 23 (Abt. V, Teil 1): **Dittler,** Allgemeine Registriertechnik. — **Broemser,** Anwendun mathematischer Methoden. — **Müller,** Injektionstechnik. — Technik der Transfusion un Infusion. — Allgemeine Methodik zur Untersuchung überlebender Organe. . . M 35.—

Lfg. 24 (Abt. XIII, Teil 1): **Marxer,** Malleus. — **Aujeszky,** Tollwut. — **Zeller,** Rinderpest. — Abortus. — **Giese,** Lungenseuche. — Bradsot. — **v. Werdt,** Rauschbrand. — Tetanus M 30.—

Lfg. 25 (Abt. I, Teil 3): **Herzig,** Makrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. — **Lieb,** Mikrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. — **Wohack,** Maßanalytisch Mikromethoxylbestimmung. — **Simonis,** Qualitative und quantitative Bestimmung de Azetylgruppen. — **Biehringer,** Maßanalyse . . . . M 24.—

Lfg. 26 (Abt. I, Teil 8): **Schulz,** Blutfarbstoffe. — **Küster,** Komponente des Blutfarbstoffes. — Porphyrine. — Abbau des Hämatins und der Porphyrine, Synthese der Spaltungsprodukte. — Pyrrolderivate. — Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte des Bilirubins. . . . . M 27.

Lfg. 27 (Abt. VI, Teil B.): **Klemm,** Wahrnehmungsanalyse. . . . . M 16.5

Lfg. 28 (Abt. X): **Halbfass,** Seenforschung. — **Arldt,** Paläographie. . . . . . . M 21.—

Lfg. 29 (Abt. IV, Teil 9): **Haselhoff,** Bestimmung der Zusammensetzung der Nahrungsmittel de Tiere. — **v. Gröer,** Ernährungssystem von v. Pirquet. — **Aron** und **Gralka,** Fütterungs versuche mit künstlich zusammengesetzten Nährstoffgemischen. . . . . . M 30.—

Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum. Nachweis und Bestimmung von Porphyrin in Leber, Niere und anderen Organen. Nachweis von Porphyrin in Knochen.

Von **O. Schumm**, Hamburg.

Aus der Gruppe der Porphyrine sind für die Biologie und Pathologie namentlich das von *Nencki* aus Hämin künstlich dargestellte Hämatoporphyrin sowie das natürlich vorkommende Urinporphyrin (= Harnhämatoporphyrin) und Kotporphyrin von Bedeutung geworden. Für die Auffindung und Bestimmung dieser Stoffe ist ihr spektrales Verhalten von großer Wichtigkeit. Die zurzeit bekannten, rein chemischen Verfahren lassen sich mit Aussicht auf Erfolg nur in solchen Fällen versuchen, wo es sich um den Nachweis größerer Mengen handelt, wie sie bislang nur nach intravenöser Injektion derartiger Stoffe im Blute angetroffen sind[1]). Beobachtungen über das natürliche Vorkommen im menschlichen Blute liegen vor in den Untersuchungen bei kongenitaler Hämatoporphyrie[2]), bei der der Verfasser in den letzten Jahren wiederholt geringe Mengen von Porphyrin als Bestandteil des Serums nachweisen konnte.

I. Nachweis von Porphyrin im Blutserum.

Die Prüfung des Blutserums erfolgt durch spektroskopisch-chemische Reaktionen, vorteilhaft unter Anwendung des vom

[1]) *Friedrich Meyer-Betz* (Untersuchungen über die biologische [photodynamische] Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **112**. 468 [1913]) ließ sich eine intravenöse Injektion von 0·2 *g* Hämatoporphyrin-*Nencki* in 10 cm^3 $n/_{10}$-Natronlauge und 300 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung machen, zwei Stunden später einen Aderlaß von 120 cm^3. Im abzentrifugierten Serum zeigten sich „auch noch in starker Verdünnung die charakteristischen Streifen des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung".

[2]) *O. Schumm*: Beiträge zur Kenntnis der Haematoporphyria congenita (*H. Günther*) und der natürlichen Porphyrine. Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 123 (1916) und **105**. 158 (1919).

Verfasser angegebenen Gitterspektrometers[1]), dessen Spalt mit einer Nernstlampe unter Einschaltung einer Kondensorlinse hell beleuchtet wird.

Das Blut wird, am besten nüchtern, durch Venenpunktion entnommen und zur Gewinnung des Serums zentrifugiert. Das Serum soll möglichst klar sein, ist also nötigenfalls noch durch ein dichtes (hartes) Filter zu filtrieren. Stärkere Opaleszenz des Serums kann die Schärfe der spektroskopisch-chemischen Proben bedeutend beeinträchtigen.

Die Erkennung des Porphyrins gründet sich hauptsächlich auf das spektrale Verhalten seiner alkalischen und salzsauren Lösungen, deren Absorptionsbilder voneinander verschieden, aber beide sehr eigenartig sind. Urinporphyrin und Kotporphyrin in wässeriger alkalischer Lösung geben einander sehr ähnliche Spektra mit vier deutlichen Absorptionsstreifen im Orange Grün und im Grenzgebiet Grün-Blau. Bezüglich des Ortes der Absorptionsstreifen bestehen geringe Unterschiede je nach dem Gehalt der Lösungen an Natriumbikarbonat, Natriumkarbonat oder Kaliumhydroxyd. Als Richtschnur mögen die folgenden von mir[2]) festgestellten Werte für den Ort der Streifen bei Lösungen der drei oben genannten Porphyrine in n/10-Kalilauge dienen[3]):

Lösungen in n/10-Kalilauge.

	Zeichen der Absorptionsstreifen	Harnhämatoporphyrin (= *Fischers* Urinporphyrin) nach *H. Fischers* Verfahren aus dem Methylester dargestellt	Hämatoporphyrin aus Hämin nach *Nenckis* Verfahren dargestellt	Kotporphyrin nach *H. Fischers* Verfahren aus dem Methylester dargestellt
Okulare Bestimmungen mit dem Gitterspektrometer	I.	611·3	618·5	617·5
	II.	559·3	566·0	565·5
	III.	538·4	541·0	538·3
	IV.	501·8	504·0	503·3

Der Absorptionsstreifen II der alkalischen Lösungen obiger Porphyrine ist auffallend unsymmetrisch, seine dunkelste Stelle liegt blauwärts von der Mitte und ist nur schwierig genau bestimmbar.

[1]) Vgl. Kapitel „Spektrographische Methoden zur Bestimmung des Hämoglobins und verwandter Farbstoffe".

[2]) *O. Schumm*: Untersuchungen über die Absorptionserscheinungen des Hämatoporphyrins und Mesoporphyrins im Gitterspektrum. Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**. 1 (1914); ferner Beiträge zur Kenntnis der Haematoporphyria congenita (*H. Günther*) und der natürlichen Porphyrine. Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**. 123 (1916).

[3]) Ein fünfter Streifen im Blau (bei Urinporphyrin etwa auf 462·5, bei Kotporphyrin auf etwa 559, bei *Nenckis* Hämatoporphyrin auf etwa 461) kann in kaliumhydroxydhaltigen Lösungen auftreten, wenn sie genügend stark belichtet werden. Vgl. *O. Schumm*: l. c. **90**. 14 (1914); ferner **98**. 163 und 166.

Bei Anwesenheit größerer Mengen von Porphyrin im Blut würde man demnach, sofern Oxyhämoglobin, Methämoglobin und Hämatin fehlen oder nur in Spuren vorhanden sind, ein Absorptionsbild zu erwarten haben, das auch in geringer Schichtdicke deutlich wenigstens die Streifen I bis III zeigt, während der Streifen IV, besonders wenn ziemlich viel Bilirubin vorhanden ist, in der allgemeinen Absorption im Grenzgebiet von Grün und Blau untergehen kann.

Sind nur geringe Mengen von Porphyrin vorhanden, so wird man die drei ersten, allenfalls auch den vierten Absorptionsstreifen des alkalischen Porphyrinspektrums nur dann deutlich erkennen und am berechneten Orte finden, wenn die eben erwähnten anderen Farbstoffe nicht oder nur in Spuren vorhanden sind und das Serum in genügender Schichtdicke, von etwa 3 bis 4 *cm*, beobachtet wird; der dritte, schmale und symmetrische Streifen wird besonders gut bestimmbar sein.

Ich habe vielfach frisches menschliches Blutserum untersucht, dem ich sehr kleine Mengen von Urinporphyrin oder Kotporphyrin, in Sodalösung gelöst, zugesetzt hatte. Für Urinporphyrin enthaltende Sera fand ich folgende Werte:

I. Streifen auf ungefähr $\mu\mu$ 611·5.

II. Streifen, unsymmetrisch, dunkelste Stelle blauwärts von der Mitte auf ungefähr 560.

III. Streifen, symmetrisch, auf 538·5.

IV. Streifen, violettwärts nicht deutlich abgegrenzt, dunkelste Stelle auf ungefähr 560.

Zusatz von einem Viertel Raumteil 15%iger Kalilauge bewirkte keine wesentliche Veränderung des Absorptionsbildes, nur erschien der Streifen I im Orange danach einige Male etwas verschwommener.

Für Kotporphyrin enthaltendes Serum fand ich:

I. Streifen auf ungefähr 613.

II. Streifen, unsymmetrisch, dunkelste Stelle blauwärts von der Mitte auf ungefähr 562.

III. Streifen, symmetrisch, auf 537.

IV. Streifen, violettwärts nicht deutlich abgegrenzt, dunkelste Stelle auf ungefähr 503.

Zusatz von einem Viertel Raumteil 15%iger Kalilauge bewirkte öfter eine geringe Veränderung des ersten Streifens im Orange, so daß dessen Lage jetzt zu ungefähr 616 bestimmt wurde. Bei sehr geringem Gehalt war die Ortsbestimmung des I. Streifens des Kotporphyrins mehrfach nicht mit der erwünschten Genauigkeit durchzuführen.

Bei der Prüfung eines Serums auf Porphyringehalt hätte man demnach zunächst durch spektroskopische Besichtigung des reinen Serums festzustellen, ob es die oben beschriebenen Absorptions-

streifen ganz oder teilweise erkennen läßt. Nach möglichst genauer Ortsbestimmung durch Feststellung der dunkelsten Stelle jedes einzelnen Streifens wäre das Serum mit etwas 15 %iger Kalilauge zu mischen und die danach vorhandenen Absorptionsstreifen erneut ihrer Form und Lage nach zu bestimmen.

Nunmehr wäre an einer neuen Probe des Serums zu prüfen, ob bei Zusatz von Salzsäure das sogenannte Porphyrin-Säurespektrum auftritt, d. i. das eigenartige, mehrstreifige Absorptionsbild von Lösungen der Porphyrine in überschüssiger Salzsäure. Das Porphyrin-Säurespektrum zeigt bei schwächsten Lösungen nur den Streifen III, bei zunehmendem Porphyringehalt auch die Streifen I und II, endlich auch die schwachen Streifen IV und V. Ich stelle die von mir für den Ort der Streifen festgestellten Werte hier zusammen[1]).

Lösungen in wässeriger Salzsäure vom spez. Gewicht 1·124 (= 25% HCl).

	Zeichen der Absorptionsstreifen	Harnhämatoporphyrin (= *Fischers* Urinporphyrin) nach *H. Fischers* Verfahren aus dem Methylester dargestellt	Hämatoporphyrin aus Hämin nach *Nenckis* Verfahren dargestellt	Kotporphyrin nach *H. Fischers* Verfahren aus dem Methylester dargestellt
Okulare Bestimmungen mit dem Gitterspektrometer	I.	596·7	595·3	593·1
	II.	577·0	574·5	573·5
	III.	553·4	552·0	549·9
	IV.	526·3	526·0	524·5
	V.	511·8	511·0	509·3
Spektrogrammetrische Bestimmungen nach Aufnahmen mit d. Gitterspektrographen	I.	597·1	595·5	593·6
	III.	554·1	551·7	550·2
	VI.	410·7	407·5	405·8

Für den Nachweis kleinerer Mengen von Porphyrin im Blutserum kommen in erster Linie die Streifen I und III in Betracht, die beide auch bei Anwesenheit von etwas Oxyhämoglobin, Methämoglobin oder Hämatin deutlich hervorzurufen sind. Streifen I ist bedeutend schmäler als Streifen III, beide sind gut bestimmbar. Um bei porphyrinhaltigem Blute das Porphyrin-Säurespektrum hervorzurufen, muß dem Blutserum Salzsäure in solchem Mengenverhältnis zugesetzt werden, daß keine Trübung oder Niederschlagbildung durch Ausfällung von Eiweiß erfolgt. Man erreicht das,

[1]) l. c. Der an fast farblosen Lösungen der Porphyrine in Salzsäure spektrographisch sehr gut nachweisbare Violettstreifen ist von mir für den Nachweis des Porphyrins im Blutserum noch nicht verwertet worden.

indem man entweder das Serum in die zwei- bis dreifache Menge 25%iger Salzsäure hineintropft oder aber, indem man 3 cm^3 Serum mit zwei Tropfen 25%iger Salzsäure versetzt und sogleich durch Umschütteln mischt. Die spektroskopische Prüfung ist dann ohne Zeitverlust vorzunehmen. Bei dem letztgenannten Mischungsverhältnis bleibt nach meinen zahlreichen Versuchen am Blutserum Kranker das Serum klar genug, um daran noch in 3 bis 4 *cm* Schichtdicke die spektroskopische Untersuchung ausführen zu können. Andererseits genügt dieser geringe Säurezusatz, um bei Anwesenheit von Porphyrin dessen „Säurespektrum" zu erzeugen. Diese Probe habe ich bei meinen eigenen Untersuchungen an natürlichem porphyrinhaltigen Blutserum hauptsächlich benutzt. Wie ich schon an anderer Stelle erörtert habe, verschiebt sich die ganze Streifengruppe des Absorptionsbildes der sauren Porphyrinlösungen mit abnehmendem Säuregehalt nach Violett. Deshalb treffen die oben angegebenen Grundwerte für den Ort der Streifen bei 25% Salzsäure enthaltenden Lösungen für die schwächer salzsäurehaltigen Gemische aus 3 cm^3 Serum und zwei Tropfen Salzsäure nicht zu, angenähert dagegen für Gemische aus z. B. 3 Raumteilen 25%iger Salzsäure und 1 Raumteil Serum. Man findet vielmehr bei Gemischen aus 3 cm^3 Blut, dem eine geringe Menge Urinporphyrin in Sodalösung gelöst zugesetzt war, und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure folgende Werte:

Streifen I $\mu\mu$ 593 Streifen III $\mu\mu$ 549·75.

Wird statt Urinporphyrin Kotporphyrin zugesetzt, so findet man:

Streifen I $\mu\mu$ 590·75 Streifen III 547·75.

Eine künstliche Abspaltung von Porphyrin oder das Porphyrinspektrum liefernden Stoffen aus Oxyhämoglobin oder Hämatin ist nach meinen Versuchen bei dieser Probe nicht zu befürchten; ich habe bei zahlreichen hämatinhaltigen und oxyhämoglobinreichen Sera niemals bei dieser Probe ein Porphyrinspektrum auftreten sehen. Ein durch den Hämatingehalt bedingter ziemlich breiter Streifen im Grün auf ungefähr 547 oder 548, der blauwärts meistens nur undeutlich abgegrenzt ist, kann nicht zu Verwechslungen führen, wenn man beachtet, daß für den qualitativen Nachweis von Porphyrin im Blutserum unbedingt auch die Feststellung des schmalen Streifens I verlangt werden muß. Ich lasse nunmehr einige Angaben über das Verhalten des Blutserums eines an Hämatoporphyria congenita leidenden Kranken bei dieser Probe folgen.

Erste Blutentnahme.

2 cm^3 Serum und 1 Tropfen 25%iger Salzsäure: Streifen I etwa 592·5, Streifen III etwa 549.

3 cm^3 Serum und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure: dasselbe Ergebnis.

Zweite Blutentnahme.

3 *cm*³ Serum und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure: Streifen I 592·75, Streifen III 549·5.

Dritte Blutentnahme.

3 *cm*³ Serum und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure: Streifen I angenähert 593, Streifen III angenähert 549.

Vierte Blutentnahme.

3 *cm*³ Serum und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure: Streifen I etwa 592·75, Streifen III etwa 549·5.

Fünfte Blutentnahme.

3 *cm*³ Serum und 2 Tropfen 25%iger Salzsäure: Streifen I 593·5, Streifen III 549·5.

Sechste Blutentnahme.

3 *cm*³ Serum und 2 Tropfen 25%ige Salzsäure: Streifen I ungefähr 593, Streifen III 549·5.

Wie man sieht, stimmt die gefundene Lage der Streifen befriedigend mit der berechneten überein. Der bedeutende Gehalt an Hämatin, der dem Blute dieses Kranken gleichzeitig eigentümlich ist, stört den Nachweis des Porphyrin-Säurespektrums nicht. Für den Nachweis des Porphyrins durch diese Reaktion liegen die Verhältnisse aus folgenden Gründen so günstig: Das etwa gleichzeitig vorhandene Oxyhämoglobin wird durch die Salzsäure unter Abspaltung von Hämatin zersetzt, die zwei Oxyhämoglobinstreifen auf 577·5 und 542 verschwinden also; das Hämatin in saurer Lösung gibt aber verhältnismäßig nur eine sehr schwache Absorption, durch die die Deutlichkeit des Streifens I des Porphyrin-Säurespektrums nicht beeinträchtigt wird. Für das auf den mittleren Teil des Spektrums zusammengedrängte Absorptionsbild des Porphyrin-Säurespektrums sind ferner die Wahrnehmungsbedingungen günstiger als für das Spektrum des Porphyrins in alkalischer Lösung, dessen stärkster Streifen an ungünstiger Stelle (Grenze von Grün zu Blau) liegt, die durch Blutserum in größerer Schichtdicke schon bei gewöhnlichem Farbstoffgehalt, mehr noch bei vermehrtem Bilirubingehalt eine starke Absorption erfährt.

Wie oben schon angegeben ist, sind im ursprünglichen Serum bei Porphyrinanwesenheit vier Absorptionsstreifen zu erwarten, deren stärkster aber aus dem eben angeführten Grund nicht genau feststellbar zu sein braucht. Enthält das Serum neben geringen Mengen Porphyrin gleichzeitig beträchtliche Mengen an

vorgebildetem Hämatin, so weist das Serum im Rot-Orange einen breiten Absorptionsstreifen auf, der den schmäleren des Porphyrins (etwa 611 oder 617) mehr oder weniger verdeckt, so daß dieser günstigenfalls nur als Verstärkung eines Teiles der breiten Verdunkelung, als „Maximum“ ungefähr in der Gegend von 611 oder 617 wahrnehmbar sein wird; in dem von mir beobachteten Falle war er z. B. als schmales Maximum auf ungefähr 615 zu erkennen. Ist gleichzeitig Oxyhämoglobin vorhanden, so wird durch dessen Streifen I auf 577·5 allenfalls der Streifen II des Porphyrinspektrums und durch den Streifen II des Oxyhämoglobins auf 542 der Streifen III des Porphyrins auf 538·5 in seiner Deutlichkeit beeinträchtigt; indessen konnte ich in meinem Falle den Streifen III des Porphyrins mit Sicherheit zu 539 bestimmen, so daß hier der recht schwache Streifen II des Oxyhämoglobins auf 542 vollständig übertönt war und nicht störend zur Geltung kam.

II. Mengenbestimmung des Porphyrins.

Eine genaue Mengenbestimmung des Porphyrins im Blutserum ist nur bei größerem Porphyringehalt möglich, und wenn die Art des vorhandenen Porphyrins bekannt ist. Bei größerem Porphyringehalt ist die Lichtabsorption an den Orten der einzelnen Absorptionsstreifen im Verhältnis zu der durch die übrigen Serumbestandteile bedingten Lichtschwächung so groß, daß letztere bei der vergleichend spektroskopischen oder spektrokolorimetrischen Untersuchung von Blutserum und Vergleichsflüssigkeit kaum mehr ins Gewicht fällt. Bei geringem Porphyringehalt kann die allein in Betracht kommende spektrokolorimetrische oder spektrophotometrische Bestimmung nur angenähert richtige Werte geben, weil das Serum eben außer dem Porphyrin noch andere allgemein oder in örtlicher Begrenzung lichtschwächende Stoffe enthält. Rein chemische Verfahren würden sich erst bei weit größeren Mengen anwenden lassen.

Um den Porphyringehalt im Serum zu bestimmen oder bei sehr geringen Mengen wenigstens zu schätzen, bedarf man einer Vergleichslösung von bekanntem Porphyringehalt. Aus den oben erörterten Gründen erscheint es richtig, sowohl im Serum als in der Vergleichslösung durch Zusatz von Salzsäure, und zwar in gleichen Mengen, das Porphyrin-Säurespektrum zu erzeugen. Man stellt nun fest, wie stark die Vergleichslösung mit Wasser zu verdünnen ist, bis eine Probe bei Zusatz der Salzsäure die Porphyrinabsorptionsstreifen in derselben Stärke zeigt wie das mit Salzsäure gemischte Serum. Man kann auch etwas anders verfahren, indem man die salzsäurehaltige Vergleichslösung allmählich mit wässeriger Salzsäure der erforderlichen Stärke so weit verdünnt, daß diese Lösung

die Absorptionsstreifen in gleicher Stärke zeigt wie das Gemisch aus Serum und Salzsäure. Ich wählte bei meinen Versuchen das Verhältnis 3 *cm*³ Serum und zwei Tropfen 25%iger Salzsäure.

Zur Ausführung der Untersuchung ist ein Vergleichsspektroskop erforderlich, das in sicherer Weise die Erzeugung zweier gleich lichtstarker und genau vergleichbarer Spektra gestattet und mit einer für die Untersuchung des Serums in größerer Schichtdicke (z. B. 3 bis 4 *cm*) geeigneten starken Lichtquelle, am besten Nernstlampe (allenfalls Osramlampe mit geeigneter Form des Glühfadens) und Kondensor betrieben wird.

Ein anderes Verfahren besteht darin, daß man sowohl vom Blutserum als auch von der passend zu verdünnenden Vergleichslösung diejenige Schichtdicke bestimmt, in der bei Zusatz der Salzsäure das Porphyrinspektrum eben noch erkennbar ist. Je nachdem die Mischung aus Serum und Salzsäure den Streifen I oder III des Porphyrin-Säurespektrums klarer zeigt, würde man für die Feststellung entweder den Streifen I oder III wählen. Zur Ausführung des letztgenannten Verfahrens bediene ich mich des oben erwähnten Gitterspektrometers. An der Beleuchtung und Einstellung des Apparates darf natürlich bei diesen nacheinander vorzunehmenden Proben nichts geändert werden, da die Deutlichkeit der Absorptionsstreifen von der Lichtstärke des Spektrums mit beeinflußt wird. Ebensowenig darf die Spaltweite geändert werden. Die Berechnung ergibt sich auch bei diesem Verfahren von selbst. Zeigt z. B. das Gemisch aus Serum und Salzsäure den Streifen I gerade erkennbar noch in 3 *cm* Schichtdicke, die zehnfach verdünnte Vergleichsflüssigkeit noch in 1·5 *cm* und enthält die unverdünnte Vergleichsflüssigkeit in 100 *cm*³ 0·02 *g* Porphyrin, so enthält das Serum ein Zwanzigstel dieses Porphyringehaltes, d. h. 0·001 *g* in 100 *cm*³

III. Nachweis und Bestimmung von Porphyrin in Leber, Niere und anderen Organen.

Ein sehr reichlicher Gehalt, wie er allerdings bis jetzt wohl noch nicht beobachtet ist, würde sich voraussichtlich schon an einem verdünnten wässerig alkalischen Auszug des Organs durch das vierstreifige Spektrum[1]) feststellen lassen. Der Nachweis kleiner Mengen gelingt in Auszügen der Organmasse mit wässeriger oder alkoholischer Salzsäure.

Das Organ wird vor der Behandlung mit dem Extraktionsmittel fein zerhackt oder zermahlen. Zieht man z. B. menschliche Leber, der etwas Urinporphyrin zugesetzt war, mit der vierfachen

[1]) Vgl. das Kapitel „Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum".

Menge 25%iger Salzsäure aus, filtriert und spektroskopiert das Filtrat, so findet man die beiden Hauptstreifen I (schmal) und III (breiter und dunkler) des Urinporphyrin-Säurespektrums, dem etwa 20% betragenden Gehalt der Lösung an Salzsäure entsprechend, auf etwa $\mu\mu$ 596 und 552. War statt Urinporphyrin Kotporphyrin zugesetzt, so findet man die beiden Streifen auf etwa 592·75 und 549·5. Demnach lassen sich bei diesem Vorgehen, wenn man unter genau gleichen Versuchsbedingungen arbeitet, Urinporphyrin und Kotporphyrin unterscheiden. Zu empfehlen sind Kontrollversuche mit Organmasse, der eine kleine Menge des fraglichen reinen Porphyrins, in einem Tropfen Sodalösung gelöst, zugesetzt war. Ändert man das Mischungsverhältnis von Organmasse und 25%iger Salzsäure, so findet man den Ort der Streifen etwas abweichend, da die ganze Streifengruppe des Porphyrin-Säurespektrums sich mit fallendem Salzsäuregehalt nach Violett, mit steigendem nach Rot verschiebt.

Zum einfachen Nachweis geringer Mengen von Porphyrin hat sich mir die Extraktion der Organmasse mit der dreifachen Gewichtsmenge eines Gemisches aus einen Teil 25%iger Salzsäure und 19 Teilen Alkohol gut bewährt. Benutzt man zu dem Versuche z. B. menschliche Leber oder Niere, so zeigt das Filtrat bei Anwesenheit von Urinporphyrin die beiden Hauptstreifen I und III des Porphyrin-Säurespektrums auf etwa $\mu\mu$ 593·5 und 550·5, bei Anwesenheit von Kotporphyrin dieselben Streifen um ungefähr 1 $\mu\mu$ weiter violettwärts. Der Unterschied zwischen Urinporphyrin und Kotporphyrin ist also in schwach salzsäurehaltigem Alkohol geringer als in wässeriger Salzsäure (siehe oben). Das Porphyrin-Säurespektrum läßt sich in dem Salzsäurealkoholauszug trotz der gleichzeitigen Anwesenheit des aus dem Blutfarbstoff durch die Salzsäure gebildeten Hämatins gut erkennen. Ein in derselben Weise aus porphyrinfreiem Organ, z. B. menschlicher Niere, hergestellter Salzsäurealkoholauszug zeigte nur die drei Streifen des Hämatin-Säurespektrums, einen starken Streifen im Rot auf ungefähr 636, einen schwachen Streifen auf 544 und einen etwas stärkeren auf ungefähr 501. Man könnte vermuten, daß der Streifen des Hämatins auf 544 die Erkennung des Hauptstreifens III des Porphyrins auf ungefähr 550, da der Lageunterschied nur ziemlich gering ist, verhindern würde; das ist aber nicht der Fall, der Streifen des Hämatins wird vielmehr durch den kräftigeren Streifen des Porphyrins übertönt. Selbstverständlich ist für den Nachweis des Porphyrins auch die Feststellung des Streifens I auf ungefähr 593·5 zu verlangen. In dem von *Hegler*, *Fraenkel* und mir beschriebenen Fall von Hämatoporphyrie[1]) konnte ich nach dem letztgenannten

[1]) *C. Hegler*, *Eug. Fraenkel* und *O. Schumm*: Zur Lehre von der Haematoporphyria congenita. Deutsche med. Wochenschr. 1913, Nr. 18.

Verfahren einen sehr geringen, in der Leber einen vielfach stärkeren Porphyringehalt nachweisen; für den Salzsäurealkoholauszug der Leber fand ich den Ort der beiden Hauptstreifen I zu 593, II zu ungefähr 551.

Eine quantitative Bestimmung oder wenigstens Schätzung der Menge des Porphyringehaltes ließe sich bei sinngemäßer Anwendung der im Abschnitt „Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum" gegebenen Richtlinien an Salzsäurealkoholauszügen der Organmasse durchführen.

IV. Nachweis von Porphyrin in Knochen.

a) Spektroskopische und spektrographische Prüfung von Knochenschliffstücken.

Ein Porphyringehalt der Knochen läßt sich unter günstigen Umständen unmittelbar durch spektroskopische oder spektrographische Prüfung von Knochenschliffstücken feststellen[1]). Dazu ist freilich nötig, daß die Schliffstücke den Farbstoff dicht eingelagert enthalten und dabei doch genügend durchscheinend sind. In dem von *Hegler*, *Fraenkel* und mir beschriebenen Falle von Hämatoporphyrie habe ich so den Porphyringehalt ohne eine chemische Vorbehandlung der Knochen feststellen können.

Man sägt ein möglichst gleichmäßig und stark gefärbtes Stück des Knochens von 2 oder mehr Millimeter Dicke und einem oder mehr Quadratzentimeter Fläche ab und stellt daraus durch Feilen ein ebenes Stück her, das nur etwa 0·5 *cm* breit und so lang zu sein braucht, daß es den Spalt des Spetroskops oder Spektrographen reichlich überdeckt. Ober- und Unterseite des Knochenplättchens müssen zuletzt durch Feilen mit einer feinen Feile oder durch Schleifen auf einem kleinen ebenen Schleifstein geglättet werden. Man befestigt es dann mit einer geeigneten Klammer unmittelbar vor dem Spalt des Apparates. Ich benutze zu diesen Untersuchungen ein Gitterspektrometer[2]) sowie einen Gitterspektrographen[3]). Zur Beleuchtung des Apparates ist eine sehr starke Lichtquelle erforderlich, am besten Nernstlampe. Zunächst werden Lampe und Kondensorlinse so gestellt, daß das von dem Kondensor entworfene, nur einige Millimeter breite Bild des Glühstiftes der Nernstlampe den Spalt symmetrisch überdeckt. Man befestigt nun das Knochenplättchen unmittelbar vor dem Spalt des Apparates und beobachtet, ob das Spektrum scharf und deutlich genug ist und sucht nötigenfalls durch geringes Verschieben des

[1]) *C. Hegler, Eug. Fraenkel* und *O. Schumm* l. c.

[2]) Vgl. Abschnitt „Nachweis und Bestimmung von Hämatin im Blutserum".

[3]) Vgl. Abschnitt „Spektrographische Methoden zur Bestimmung des Hämoglobins und verwandter Farbstoffe".

Kondensors die günstigste Beleuchtung zu erreichen. Die Weite des Spaltes ist so gering wie möglich zu wählen. Man versucht deshalb zuerst eine Spaltweite von etwa 0·03 *mm* und erweitert den Spalt nötigenfalls. Die Ortsbestimmung der Streifen erfolgt in bekannter Weise durch Einstellen der Okularmarke (Fadenkreuz) auf die dunkelste Stelle jedes Streifens, läßt sich aber der geringen Lichtdurchlässigkeit der Knochenmasse wegen natürlich durchweg nicht so genau ausführen wie bei den oben besprochenen Porphyrinlösungen. In dem oben genannten Falle von menschlicher Hämatoporphyrie fand ich so durch okulare Messung an 0·5 bis 1 *mm* dicken Knochenschliffstücken für den Ort der vier Absorptionsstreifen: I. 619, II. 572·5, III. 539, IV. angenähert 503.

Bei der spektrographischen Untersuchung dieses Knochens fand ich für dieselben Streifen: I. 617, II. 568, III. 539·6, IV. 502.

In einem Falle tierischer Osteohämochromatose bei einem Rind fand ich bei gleichem Vorgehen ebenfalls ein vierstreifiges Spektrum und für den Ort der Streifen: I. ungefähr 617, II. 572, III. 541, IV. ungefähr 498.

Bei einem weiteren Falle tierischer Osteohämochromatose fand ich für die Streifen: I. ungefähr 616, II. ungefähr 571, III. 539, IV. (nur ganz angenähert bestimmbar) ungefähr 495. Bei einem dritten Falle zeigten die Schliffstücke den ersten Absorptionsstreifen im Rot nur angedeutet als schwachen Schatten, die drei anderen Streifen dagegen deutlich auf etwa 570, 539 und 498.

Zu der spektrographischen Untersuchung benützt man zweckmäßig einen Gitterspektrographen, ich bediene mich des von mir angegebenen, im Kapitel „Spektrographische Methoden usw.“ beschriebenen Gitterspektrographen mit vertikalem Spalt. Für die Beleuchtung des Apparates gilt das oben Gesagte. Das Knochenplättchen befestigt man unmittelbar vor dem Spalt oder bringt es in ein rechteckiges, aus planparallelen Glasplatten hergestelltes Glaskästchen (sogenanntes Absorptionsgefäß), das mit Zedernöl gefüllt ist. Wählt man ein Glas, dessen innere Weiten etwa 2 × 10 *mm* betragen, so läßt sich das Knochenplättchen darin leicht so aufstellen, daß seine Fläche der Wand parallel ist. Das Glaskästchen wird möglichst dicht vor dem Spalt des Spektrographen aufgestellt. Die bei meinen spektrographischen Untersuchungen sonst bevorzugte geringe Spaltweite von nur 0·03 *mm* läßt sich bei den spektrographischen Aufnahmen der Knochenschliffe nicht immer einhalten, man ist vielmehr oft genötigt, eine größere Spaltweite, 0·05 bis 0·06 *mm*, zu wählen. Am besten beobachtet man zunächst das Spektrum auf der Mattscheibe. Ist das Absorptionsbild bei 0·03 *mm* Spaltweite zu lichtschwach und undeutlich, so vergrößert man die Spaltweite, etwa auf 0·05 bis 0·06 *mm*, und führt einige Probeaufnahmen bei einer Belichtungszeit von z. B. 5, 10, 18,

25 Minuten aus. Wegen der Einzelheiten des spektrographischen Verfahrens sowie der Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen auf den Spektrogrammen vgl. man das Kapitel „Spektrographische Methoden usw.“. Da der Farbstoff in Knochen nicht ganz gleichmäßig verteilt ist bezw. ihn nicht lückenlos durchsetzt, so erscheinen die Absorptionsstreifen auf den Platten bezw. den Abdrucken nicht in ihrer ganzen Höhe gleich dunkel. Die bei den Platten (Negativen) durch Feststellung des Helligkeits-, bei den Abdrucken oder Positiven durch Bestimmung des Dunkelheitsmaximums erfolgende Ortsbestimmung der Streifen wird dadurch aber nicht gestört.

b) Herstellung und Untersuchung von Auszügen der Knochen.

Sind die Knochen sehr fettig, so empfiehlt es sich, sie zunächst mit Äther oder ähnlichem zu reinigen.

1. Auszüge mit Sodalösung.

Dieses Verfahren ist zuerst von *H. Tappeiner* benützt worden[1]). Man stellt durch Schaben des Knochens mit einem Glasscherben (*Tappeiner*) feine Lamellen her oder zerraspelt sie mit einer feinen Raspel oder zerfeilt sie zu Pulver, übergießt diese zerkleinerte Knochenmasse mit dünner 1- bis 2%iger Sodalösung und läßt das Gemisch so lange stehen, bis genügend Farbstoff in Lösung gegangen ist, was mehrere Stunden und länger erfordern kann. Enthält dieser Auszug Porphyrin, so gibt die filtrierte Flüssigkeit mehr oder weniger deutlich das vierstreifige sogenannte alkalische Porphyrinspektrum. Bei tierischer Osteohämochromatose fand ich für den Ort der Streifen solcher Sodaauszüge: I. $\mu\mu$ 617, II. 572, III. 541, IV. ungefähr 498, nur angenähert bestimmbar, (braunrote Knochen eines Rindes).

I. $\mu\mu$ 616, II. 571, III. 539, IV. ungefähr 495, nur angenähert bestimmbar (braunrote Knochen eines Schweines).

Nach Zusatz von Salzsäure im Überschuß liefern die nötigenfalls filtrierten Lösungen ein Porphyrin-Säurespektrum.

2. Auszüge mit Salzsäurealkohol.

An Stelle des von *H. Tappeiner* bei tierischen Knochen und von *H. Günther*[2]) bei seinem Falle von Hämatoporphyria congenita beim Menschen zur Untersuchung einer Zahnwurzel benützten Gemisches aus Schwefelsäure und Alkohol (5 Gewichtsteile Schwefelsäure auf 100 Teile absoluten Alkohol) verwende ich Mischungen aus Salzsäure und Alkohol. Die damit erhaltenen Auszüge geben

[1]) *H. Tappeiner*: Untersuchung pigmentierter Knochen vom Schweine. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München. I. 1885. Sitzung vom 24. Februar 1885.

[2]) *H. Günther*: Die Hämatoporphyrie. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **105**. 89 (1911).

ein Porphyrin-Säurespektrum. Wendet man auf einen Überschuß der Knochenmasse schwachsalzsäurehaltigen Alkohol an, so erhält man bei genügend langer Einwirkungszeit Auszüge, die (höchstwahrscheinlich infolge der fast vollständigen Abstumpfung der Säure) bei der spektrographischen Untersuchung in genügend geringer Schichtdicke bezw. nach dem Verdünnen mit Alkohol zwei eng benachbarte Violettstreifen, z. B. auf μμ 408 und 400 liefern, während Lösungen des Knochenporphyrins in starker wässeriger Salzsäure spektrographisch nur einen scharfen Violettstreifen liefern, den ich bei etwa 23% Salzsäuregehalt der Lösung im Durchschnitt auf 410·5 fand (vgl. unter 3).

H. Fischer[1]) berichtet über die Prüfung der Knochen aus den Zeigefingern des Falles *Petry* (*H. Günther*s Fall von Hämatoporphyria congenita), die amputiert werden mußten, daß der Farbstoff leicht durch Alkoholsalzsäure entzogen werden konnte, daß jedoch nach dem Alkalischmachen dieses Extraktes nicht eine Spur des Farbstoffes in Chloroform überging, woraus *Fischer* schließt, daß das Porphyrin in den Knochen nicht als solches, sondern in anderer Form vorhanden gewesen sei.

3. *Auszüge mit 25%iger Salzsäure.*

Dieses von mir viel benützte Verfahren liefert durchweg in ziemlich kurzer Zeit genügend farbstoffreiche Auszüge. Je nachdem die Färbung der Knochen im wesentlichen durch Porphyrin bedingt ist oder durch Gemische aus Porphyrin mit beträchtlichen Mengen anderer Farbstoffe, zeigen die Auszüge eine mehr rote oder braune Färbung. Sie liefern demnach ein mehr oder weniger reines Porphyrin-Säurespektrum, das aber in allen von mir untersuchten Fällen als solches gut zu kennzeichnen war. Man erkennt deutlich wenigstens die beiden Hauptstreifen I und III, bei einem Gehalt der Auszüge von etwa 23% Salzsäure fand ich sie auf μμ 597 und 554, sowohl im Auszug der Knochen unseres Falles von menschlicher Hämatoporphyrie als auch bei sämtlichen Fällen von tierischer Osteohämochromatose. Bei sehr porphyrinreichen Knochen zeigt der Auszug häufig noch deutlich den schwächeren Streifen II auf ungefähr 576 oder 577 und kann außerdem allenfalls noch die beiden schwachen Streifen IV und V im Dunkelgrün (angenähert auf 528 und 513) aufweisen. Bei geringerem Gehalt an freier Salzsäure verschiebt sich die Streifengruppe um 1 bis einige μμ nach Violett.

Verdünnt man diese 23% Salzsäure enthaltenden Auszüge genügend mit 23%iger Salzsäure, so liefern sie bei geeigneter Schichtdicke einen scharfen Absorptionsstreifen im Violett auf ungefähr 410 oder 411, im Mittel meiner Versuche auf 410·5, der spektrographisch

[1]) *H. Fischer*: Beobachtungen am frischen Harn und Kot von Porphyrinpatienten. Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 167 (1916).

sehr genau nachweisbar ist und ein Mittel an die Hand gibt, den Porphyrinnachweis zu erhärten, falls die Knochen nur so geringe Mengen davon enthalten, daß der Salzsäureauszug bei der spektroskopischen Prüfung nur den zweiten stärkeren Streifen auf 554, dagegen den ersten auf 597 nicht oder nicht deutlich zeigt. Zum Nachweis des Violettstreifens macht man eine Reihe Aufnahmen des ursprünglichen und des stufenweise mit 23%iger Salzsäure verdünnten Auszuges je in 1 oder 2 *cm* Schichtdicke.

Bei der spektrographischen Untersuchung der ursprünglichen Salzsäureauszüge fand ich in unserem Falle von menschlicher Porphyrie und in drei der Fälle von tierischer Osteohämochromatose außer den dem Porphyrinsäurespektrum zugehörigen Absorptionsstreifen noch einen weiteren sehr deutlichen schmalen Absorptionsstreifen auf $\mu\mu$ 462·5, 463 oder 463·5, im Mittel also auf 463, dessen Bedeutung bislang nicht aufgeklärt ist[1]).

Machte ich die ursprünglichen Salzsäureauszüge der porphyrinhaltigen Knochen mit Ammoniak unter Kühlen schwach alkalisch, säuerte mit verdünnter Schwefelsäure an, filtrierte vom Niederschlag ab und alkalisierte mit Ammoniak, so zeigte die nötigenfalls nochmals filtrierte gelbe bis gelbbraune Flüssigkeit das vierstreifige alkalische Porphyrinspektrum. In dem mehrfach erwähnten Falle von menschlicher Hämatoporphyrie fand ich für den Ort der Streifen dieser ammoniakalischen Lösung:

I. Ziemlich symmetrisch, auf etwa 613·5.
II. Unsymmetrisch, dunkelste Stelle blauwärts von der Mitte, auf 560.
III. Symmetrisch, auf 539.
IV. Nicht ganz symmetrisch, auf ungefähr 503.

Bei tierischer Osteohämochromatose lieferte die entsprechende Lösung:

I. Ziemlich symmetrisch, auf etwa 613.
II. Unsymmetrisch, dunkelste Stelle blauwärts von der Mitte, auf etwa 561.
III. Symmetrisch, auf 539.
IV. Nicht ganz symmetrisch, auf ungefähr 503.

Wurde diese Lösung mit einem Tropfen 10%iger Chlorzinklösung und so viel Salmiakgeist versetzt, daß der entstandene Niederschlag sich wieder auflöste, so änderte sich das Spektrum allmählich, die Streifen I und IV verschwanden fast vollständig und statt der beiden mittleren Streifen erschienen die zwei neuen Streifen des sogenannten metallischen Porphyrinspektrums, Streifen I auf ungefähr 578·5, Streifen II auf ungefähr 543·5.

---

[1]) Vgl. dazu die Erörterungen in der Abhandlung: Über das Hämatoporphyrin aus Harn und Knochen. Ztschr. f. phys. Chem. **96**. 199 u 200 (1915).

Bildung, Vorkommen und Merkmale des Hämatins, Nachweis und Bestimmung von Hämatin im Blutserum.

Von **O. Schumm**, Hamburg.

Hämatin ist der bei der Spaltung des roten Blutfarbstoffes durch starke Essigsäure[1]), durch Kalilauge[2]) oder Pepsinsalzsäure[3]) entstehende eisenhaltige Farbstoff, der sich zu Hämochromogen reduzieren und in Hämin überführen läßt, dagegen nicht die chemisch-spektroskopische Methämoglobinreaktion mit Sodalösung gibt. Die Darstellung des Hämatins in Kristallform ist bislang nicht gelungen.

Lösungen von Hämatin in Sodalösung oder Kalilauge geben im Spektrum Absorptionserscheinungen, die je nach der Art der Darstellung und der mehr oder weniger vollständigen Einheitlichkeit oder Reinheit des vorliegenden Hämatins Unterschiede aufweisen. Alle solche alkalischen Hämatinlösungen liefern einen Absorptionsstreifen im Rot-Orange und nach der Reduktion das Absorptionsspektrum des Hämochromogens, d. h. zwei Absorptionsstreifen im Grün, deren Stärkeverhältnis und Lage bei den Hämatinen verschiedener Darstellungsweise höchstens geringe Unterschiede aufweist. Der Ort des Absorptionsstreifens alkalischer Hämatinlösungen im Rot-Orange wechselt nicht unbeträchtlich. Für das nach *Hoppe-Seylers* Vorschrift durch Spaltung von Oxyhämoglobin mit Eisessig hergestellte Hämatin fand ich folgende Werte: Erstes Präparat in Kalilauge gelöst: breiter, verwaschener Orangestreifen auf ungefähr $\mu\mu$ 613, zweites Präparat: auf $\mu\mu$ 607; erstes Präparat in Salmiakgeist gelöst: breiter, verwaschener Orangestreifen auf etwa $\mu\mu$ 610, zweites Präparat auf $\mu\mu$ 615. Die Lösung eines durch

[1]) Nach *Hoppe-Seyler*: Vgl. *Hoppe-Seylers* Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse. 8. Aufl. Von *H. Thierfelder*. S. 354 Berlin 1909, bei *J. Springer*.

[2]) Vgl. *A. Hamsik*: Über die Darstellung und das Umkristallisieren des Hämins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 35.

[3]) *Rich. v. Zeynek*: Zur Frage des einheitlichen Hämatins und einige Erfahrungen über die Eisenabspaltung aus Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**. 472 (1906).

Spaltung von Blutfarbstoff mit Kalilauge hergestellten Präparates in Kalilauge (frisches Blut mit der zehnfachen Menge 8%iger Kalilauge gekocht, abgekühlt, mit Eisessig im starken Überschuß versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, Ätherauszug dreimal mit Wasser ausgewaschen, das Hämatin mit überschüssiger Kalilauge ausgeschüttelt) gab einen unsymmetrischen Streifen im Orange, dunkelste Stelle gelbwärts von der Mitte auf etwa $\mu\mu$ 606.

Ein von mir durch zweitägige Verdauung von 5 cm^3 defibriniertem menschlichen Blut mit 500 cm^3 Pepsinsalzsäure (0·5 *g* Pepsin (*Grübler*) in 500 *g* 0·2%iger Salzsäure) hergestelltes „Hämatin“ war in Wasser unter Zusatz von wenig Soda mit brauner Farbe leicht löslich und wurde durch Essigsäure in braunen Flocken vollständig ausgefällt. Der durch einmaliges Umfällen aus dünner Sodalösung mit Essigsäure gereinigte Farbstoff gab, in 1%iger Sodalösung gelöst, einen deutlichen Absorptionsstreifen im Orange auf etwa $\mu\mu$ 615 und einen schwachen Schatten im Grün auf ungefähr 571, nach der Reduktion mit Schwefelammonium verhältnismäßig schwach das Hämochromogenspektrum (I. Streifen auf 559), in n/10-Kalilauge gelöst nach der Reduktion s t a r k dasselbe Spektrum, in beiden Lösungen außerdem einen schwachen Streifen auf ungefähr 583.

Ähnlich verhielt sich ein von mir aus Fäzes eines an Ulcus ventriculi leidenden Kranken dargestellter hämatinähnlicher Körper. Die ersten, acht Tage nach der Magenblutung entleerten Fäzes, ein sogenannter Teerstuhl, wurden mit der zehnfachen Menge Wasser ausgezogen; das braune Filtrat zeigte einen verwaschenen Absorptionsstreifen auf ungefähr $\mu\mu$ 627 und einen äußerst schwachen Streifen auf 577, gab nicht die Reaktionen des Methämoglobins, schied bei Zusatz von Essigsäure den Farbstoff in feinen braunen Flocken aus, die in Sodalösung gelöst, nach der Reduktion mit Schwefelammonium kein deutliches Hämochromogenspektrum, dagegen in n/10-KOH gelöst, einen Absorptionsstreifen auf etwa 613 und nach der Reduktion ein starkes Hämochromogenspektrum gaben.

Hämatin oder hämatinähnliche Stoffe sind häufig in Zystenflüssigkeiten, z. B. Pankreaszysten, gefunden worden, ein offenbar zwischen dem Hämoglobin und Hämatin stehender Farbstoff im Inhalt von Kropfzysten[1]). Außer in Pankreaszystenflüssigkeit (Absorptionsbild: Starker Streifen im Rot-Orange auf etwa $\mu\mu$ 625, zwei schwache Streifen auf 577·5 und 542; kein Methämoglobin) fand ich echtes Hämatin z. B. in einer Halszyste, neuerdings (bei mehrfach wiederholten Punktionen) in der Punktionsflüssigkeit

[1]) *Hoppe-Seyler*: Über die Extravasate in Kropfzysten. *Virchow*s Arch. **27**. 863, 392.



einer Herzbeutelentzündung ungeklärter Ursache; die keimfreie, tiefbraune Flüssigkeit gab nach dem Filtrieren und Verdünnen mit gleichviel Wasser in 0·5 *cm* Schichtdicke das in Fig. 7 *a* abgebildete Spektrum, einen starken breiten Absorptionsstreifen im Rot-Orange auf etwa 627, einen sehr zarten, schmalen, nur eben wahrnehmbaren Streifen auf 577·25, einen mäßig starken Streifen auf etwa 540 und eine sehr starke (nur bei weiterer Verdünnung als abgegrenzter Streifen auf ungefähr 494 erkenntliche) Absorption im Grenzgebiet Grün-Blau, sowie nach der Reduktion mit Schwefelammonium stark das Hämochromogenspektrum (I. Streifen $\mu\mu$ 558·5, II. etwa 529·5), während die Methämoglobinreaktionen negativ ausfielen. Die mit der zwei- bezw. dreifachen Raummenge absoluten Alkohols gemischte Flüssigkeit gab ein gelbbraunes Filtrat, das

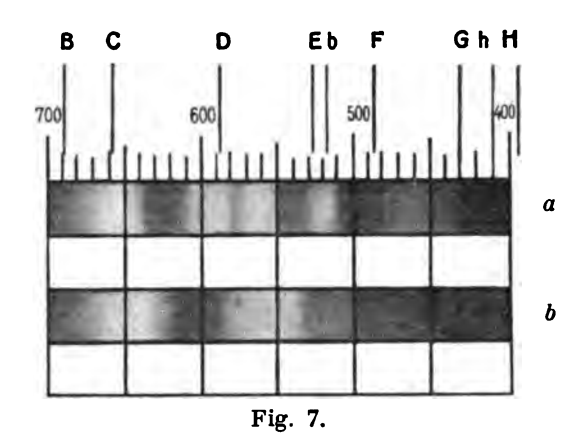


Fig. 7.

einen starken Absorptionsstreifen auf ungefähr $\mu\mu$ 604 bezw. 608 (siehe Fig. 7 *b*) zeigte und stark die Hämochromogenreaktion lieferte. Eine andere, kürzlich von mir untersuchte Punktionsflüssigkeit, in der ich an Blutfarbstoffen nur Hämatin nachweisen konnte, war in 1 *cm* Schichtdicke braun gefärbt, in dünner Schicht olivgrün, zeigte einen breiten Absorptionsstreifen auf 626, einen schwächeren auf etwa 539 und einen starken, unscharf begrenzten im Grenzgebiet Grün-Blau auf ungefähr 497.

In frischem Harne habe ich bei bestimmten Krankheitszuständen, z. B. bei Schwangerschaftseklampsie, mit Hämatinämie[1]), häufiger gelöstes Hämatin gefunden, wobei der Harn einfach auf Zusatz von Schwefelammonium ein starkes Hämochromogenspektrum gab, dagegen kommen nach meiner Erfahrung Fälle sehr

[1]) Hämatin als pathologischer Bestandteil des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 39 (1916); ferner *H. Brütt* und *O. Schumm*: Über Hämatinämie und Hämatinurie bei Eklampsie und über den Harnstoffgehalt des Liquors Eklamptischer. Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gyn. **80**. 145.

hochgradiger Hämatinurie, in denen der Harn durch feinverteiltes Hämatin schwarzbraun erscheint, keineswegs häufig vor. Gelegenheit zu einer derartigen Beobachtung bot mir ein von *C. Hegler*[1]) behandelter Fall von Peritonitis post abortum (Bakteriämie durch Bac. phlegmones emphysematosae *E. Fraenkel*). Der vier Stunden vor dem Tode in geringer Menge entleerte Harn war durch gelöstes Methämoglobin und fein verteiltes Hämatin noch in 0·5 *cm* dicker Schicht tiefbraun gefärbt und auch nach dem Filtrieren in gleicher Schichtdicke undurchsichtig. Der filtrierte Harn stellte eine konzentrierte Methämoglobinlösung dar. Das ungewöhnlich reichliche braunschwarze Sediment, das sich durch Waschen mit Wasser reinigen ließ, war (auch nach dem Trocknen) in schwach kaliumhydroxydhaltigem Wasser leicht löslich und ließ sich durch Reduktion mit Schwefelammonium glatt in Hämochromogen überführen (I. Streifen 559, II. Streifen etwa 528). In einigen der erwähnten Fälle von Schwangerschaftseklampsie mit Hämatinämie sowie in einem Falle von paroxysmaler Hämoglobinurie (mit einem Hämatingehalt des Serums = Ht 4) war das Hämatinsediment des Harnes schon in dünner Sodalösung leicht löslich, die Lösungen gaben bei der Reduktion mit Schwefelammonium das Hämochromogenspektrum. Bei dieser Gelegenheit sei bemerkt, daß ein auf der Extraktion mit Essigsäure und Äther beruhendes Verfahren zum Nachweis von Hämatin, wie es z. B. in *Neubauer-Hupperts* „Analyse des Harnes", 11. Aufl., II. Hälfte 1913, S. 1319 vorgeschlagen ist, nicht einwandfrei erscheint; das damit nachgewiesene Hämatin braucht nicht ursprünglich vorhanden gewesen zu sein, da es aus etwa vorhandenem Oxyhämoglobin durch die Einwirkung der Essigsäure entstanden sein kann. Ein positives Ergebnis dieses Verfahrens hat bei Anwesenheit von Oxyhämoglobin, Hämoglobin oder Methämoglobin keine Beweiskraft.

Von dem oben besprochenen echten Hämatin von *Hoppe-Seyler* (sogenanntes Hämatin-α, *Hansik*), sowie dem Verdauungshämatin unterscheidet sich das aus Hämin durch Kalilauge gebildete Hämatin (= Hämatin-β) ganz wesentlich dadurch, daß es sich nicht durch eine glatte Reaktion in Hämin überführen läßt (*Küster*[2]), *Hansik*[3]). Die frische Lösung eines solchen aus frischem Hämin dargestellten Hämatins in Kalilauge gab mir folgendes Absorptionsbild: Starker symmetrischer Streifen auf $\mu\mu$ 618, höchst schwacher Streifen, nur angenähert zu $\mu\mu$ 575 bestimmbar,

[1]) *C. Hegler*: Sitzungsber. d. Biol. Abt. d. Ärztl.-Ver. zu Hamburg vom 29. Oktober 1912; vgl. Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 53, S. 2924; *O. Schumm*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 174 (1913).

[2]) *W. Küster*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. **66**. 248.

[3]) l. c.

schwacher, blauwärts kaum abgegrenzter Schatten im Grün, Mitte ungefähr 532. Zusatz von Hydrazinhydrat: Lösung schön rot, gibt ein sehr starkes und reines Hämochromogenspektrum (I. Streifen $\mu\mu$ 555, II. Streifen etwa 525).

Neuerdings ist bei bestimmten Krankheiten und Vergiftungen auch im kreisenden Blute ein Hämatin aufgefunden worden[1]). Seine Abscheidung in reiner Form aus dem Blute ist noch nicht geglückt. Teils ist es nur mittelbar durch die Überführbarkeit in Hämochromogen, in vielen meiner Fälle aber außerdem durch andere spektroskopisch-chemische Proben (Feststellung des Hämatinabsorptionsstreifens im Rot - Orange, Unveränderlichkeit beim Zusatz von Sodalösung (oder n/10-KOH) nachgewiesen worden. Für die Auffindung der geringen Spuren Hämatin im Blutserum ist leider noch keine andere Reaktion anwendbar als die Überführung in Hämochromogen, die ich ausschließlich durch Schwefelammonium bewirke[2]). Bei den vielen von mir untersuchten natürlich hämatinhaltigen Sera hat sich bezüglich der Lage der Absorptionsstreifen des daraus erzeugten Hämochromogens eine vollkommene Stetigkeit ergeben. Bei dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse liegt auch bei denjenigen Fällen, in denen das Hämatin nur durch diese Reaktion nachgewiesen wurde, kein Anlaß vor, einen anderen Stoff für den positiven Ausfall der Reaktion verantwortlich zu machen, wenngleich es nicht ausgeschlossen erscheint, daß es dem bekannten und genau erforschten Hämatin nahestehende Körper, vielleicht sogar von abweichendem Molekulargewicht gibt, die nach der Reduktion im sichtbaren Spektrum das Absorptionsbild des Hämochromogens in täuschend ähnlicher Weise liefern. Für eine fruchtbare Kritik und weiteren Ausbau der jetzt üblichen Nachweismethoden im Hinblick auf solche Möglichkeiten fehlen aber vorläufig noch die tatsächlichen Unterlagen.

Bei der Untersuchung des Blutserums auf Hämatin ist auf die Möglichkeit Rücksicht zu nehmen, daß Methämoglobin, Oxyhämoglobin, Sulfhämoglobin, Porphyrin und reichlich Bilirubin vorhanden sein können.

Da eine genaue spektroskopische Beobachtung und Ausmessung der verschiedenen Absorptionsbilder durchgeführt werden muß, ist ein zuverlässiger Spektralapparat (Spektrometer) erforderlich, der mit einem symmetrischen Präzisionsspalt, Einrichtung zur genauen Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen in absoluten

---

[1]) *O. Schumm*: Hämatinämie bei toxischem Blutkörperchenzerfall. Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 1 (1912).

[2]) Ob sich das Natriumhydrosulfit als Reduktionsmittel ebensogut eignen würde, läßt sich noch nicht bestimmt angeben. da ich noch keine genügend große Zahl von Blutsera mit beiden Reduktionsmitteln vergleichend geprüft habe.

Werten (nach Wellenlängen der maximal absorbierten Lichtarten), sowie einer geeigneten Beleuchtungsvorrichtung ausgestattet ist. Ich benutze eines der von mir konstruierten Gitterspektrometer[1]).

Nach meinen Versuchen bewähren sich für unsere Zwecke unter den Gitterapparaten am besten solche, die mit einem *Thorp*schen Abzug eines Original-*Rowland*-Gitters von 3600 Furchen auf den engl. Zoll und achromatischen Objektiven (z. B. von *Carl Zeiss*, Jena oder *Steinheil*, München) mit einem Öffnungsverhältnis 1:8 und einer Brennweite von 20 *cm* ausgestattet sind. Als Fernrohrokulare benutze ich *Kellner*sche Okulare (von *Carl*



Fig. 8.

Zeiss, Jena) von 25 *mm* Brennweite und als Einstellmarke (Okularmarke) ein recht feines rechtwinkliges Fadenkreuz. Auf das Spektrum erster Ordnung eingestellt, gibt der Apparat ein Spektrum von passender Ausdehnung. Diese optischen Verhältnisse ergeben gleichzeitig eine genügende Kürze des Apparates, so daß man, ohne die Beobachtung unterbrechen zu müssen, selbst den Spalt verstellen oder das Absorptionsgefäß verschieben kann. Der Spalt ist ein symmetrischer Präzisionsspalt, *Wadsworth*scher Konstruktion in der Ausführung von *Schmidt* und *Haensch*. Die an dem Apparat angebrachte optische Bank, auf der Kondensorlinse und Objekttisch

[1]) *O. Schumm*: Mitt. a. d. Hamburg. Staatskrankenanst. **12**. H. 7, Juli 1911.

in jeder Richtung verstellbar sind, ermöglicht auf bequeme und sichere Weise die richtige Spaltbeleuchtung und sichere Aufstellung des Absorptionsgefäßes. Als Kondensorlinse genügt eine solche von etwa 2·5 *cm* Öffnung und 10 *cm* Brennweite.

Fig. 8 zeigt einen meiner Originalapparate.

Konstruktionsbeschreibung[1]):

Eine eiserne, mit Dreifuß versehene Säule ist an ihrem oberen Ende auf einer Strecke von 50 *mm* zylindrisch abgedreht und trägt ein unteres fest aufgesetztes Rotgußstück, auf das an einem Ende die „Feinbewegung" für das Beobachtungsfernrohr aufgeschroben ist, während das andere Ende die zwei als Träger des Kollimatorrohres dienenden Böcke trägt. Das Kollimatorrohr ist in den beiden oben aufgeschnittenen Böcken durch Anziehen der Schrauben unverrückbar befestigt. Über das eine Ende des Kollimatorrohres ist ein Rohrstutzen geschoben, an den die als Träger für das Gitter

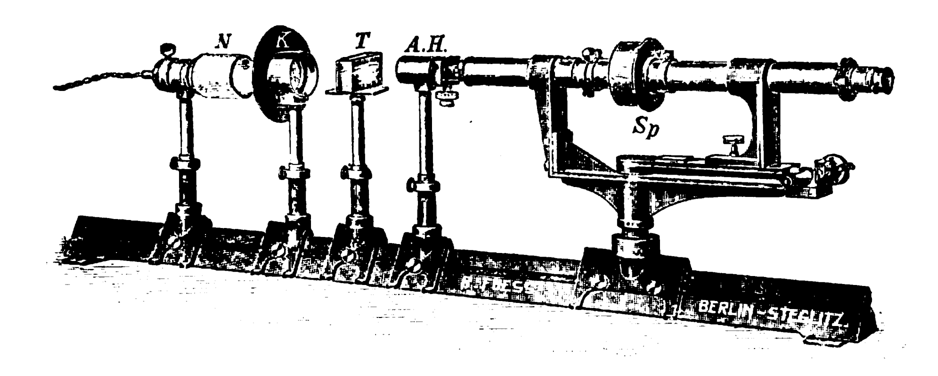


Fig. 9.

dienende ebene, mit Diaphragma versehene, Metallplatte angesetzt ist. Das andere Ende des Kollimators trägt einen symmetrischen Präzisionsspalt *Wadsworth*scher Konstruktion. Das Beobachtungsfernrohr ist in zwei Böcken gelagert, die auf einem in sicherer Führung um das abgedrehte und geschliffene obere Säulenende drehbaren Gußstück aus Rotguß befestigt sind. Die Bewegung dieses Fernrohrträgers wird durch ein Verlängerungsstück vermittelt, das mit einem Zeiger zur Ablesung der ganzen Schraubenumdrehung versehen ist und seitlich von der Schraube und dem federnden Stift der „Feinbewegung" gefaßt wird. Auf das Objektivende des Fernrohres ist eine den Gitterträger abschließende Kappe aufgesetzt. Die optische Bank besteht aus einem 11 *mm* dicken Metallstab, von rechteckigem Querschnitt und Reitern mit in der Höhe verstellbarem Objekttisch und Kondensorlinse. Der Metallstab ruht in zwei rechtwinkeligen Ausschnitten der das Kollimatorrohr tragenden metallenen Böcke und wird durch zwei Druckschrauben festgehalten. Nach Lösen der beiden Schrauben läßt er sich leicht herausnehmen.

Ein in der Wirkung und Handhabung gleicher, im Aufbau nur unwesentlich verschiedener Originalapparat ist im Kapitel „Spektrographische Methoden" abgebildet. Die Apparate werden

[1]) *O. Schumm*: Mitt. a. d. Hamburg. Staatskrankenanst. **12.** H. 7, Juli 1911.

in genauer Übereinstimmung mit meinen Konstruktionsvorschriften von den optisch-mechanischen Werkstätten von *Schmidt* und *Haensch* in Berlin, *Fuess* in Steglitz bei Berlin und *Krüss* in Hamburg hergestellt. Fig. 9 zeigt ein auf Grundlage der gleichen optischen Verhältnisse gebautes Gitterspektrometer in der Ausführung von *Fuess*, Fig. 10 in der Ausführung von *Schmidt* und *Haensch*.

Bei richtiger Ausführung und scharfer Einstellung muß das mit Sonnenlicht beleuchtete Spektrometer mit dem Okular von 25 *mm* Brennweite die Linie *D* doppelt zeigen. Die Eichung der Mikrometerbewegung erfolgt in bekannter Weise am einfachsten



Fig. 10.

nach den *Fraunhofer*schen Sonnenlinien *C*, *D*, b_1, *F*, *G*. Ist der Apparat erst einmal geeicht, so genügt zur Überwachung der Unversehrtheit der Meßvorrichtung die Probeeinstellung auf die Linie *D* des Sonnenlichtes oder auf die Linie des Natriumlichtes (Natriumbrenner von *Zeiss*, *Schmidt* und *Haensch* oder *Krüss* oder ein Bunsenbrenner, in dessen Flamme eine mit Kochsalz oder mit Soda beladene Platinöse glüht).

Auch mit einem Prismenspektroskop (richtiger Prismenspektrometer) lassen sich die Untersuchungen ausführen, sofern es die gleiche Genauigkeit der Messungen gestattet, wie sie das oben beschriebene Gitterspektrometer ermöglicht, und ein Spektrum passender Ausdehnung liefert. Geeignete optische Verhältnisse sind: ein 60gradiges Flintprisma mittlerer Dispersion[1]) Objektive

---

[1]) Näheres: *O. Schumm*, „Klinische Spektroskopie“, Jena 1909, bei *G. Fischer*, S. 24.

mit einem Öffnungsverhältnis von 1 : 5·3 bis 6·0 und einer Brennweite von ungefähr 160 *mm*, sowie ein *Keller*sches Okular (mit Fadenkreuz) von 25 *mm* Brennweite, so daß eine ungefähr sechsfache Fernrohrvergrößerung erzielt wird. Der Spalt sei auch bei den Prismenspektrometern ein symmetrischer Präzisionsspalt. Wenngleich derartige Prismenapparate lichtstärker sind, so ist doch auch zu ihrer Beleuchtung bei Serumuntersuchungen eine starke Lichtquelle erforderlich. Übermäßige Helligkeit des Spektrums, die bei Gitterapparaten allerdings im allgemeinen nicht auftritt, kann die Wahrnehmung sehr schwacher Absorptionsstreifen erschweren; durch Verschieben des Kondensors auf der dem Apparate zugehörigen optischen Bank wird die richtige Helligkeit erzielt.

Handspektroskope benutze ich für diese Untersuchungen im allgemeinen nicht, obgleich der Geübte unter besonders günstigen Bedingungen, d. h. bei einem Serum, das neben sehr wenig Oxyhämoglobin einen etwas beträchtlichen Hämatingehalt hat, auch mit einem „Handspektroskop mit Wellenlängenskala" den Hämochromogennachweis führen kann. Wo die Untersuchungsbedingungen aber ungünstiger liegen, so daß nur die genaueste Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen ein sicheres Urteil zuläßt, ist die Anwendung eines der oben erwähnten Präzisionsapparate erforderlich.

Bei der bisweilen schwierigen Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen im Rot ist das Auge vor störendem Licht gut zu schützen; man arbeitet vorteilhaft in einem durch Tageslicht nur schwach erleuchteten Raume.

Ein Gehalt an Bilirubin stört den Nachweis von Hämatin nicht, da auch bei einem sehr bilirubinreichen Serum der I. Hämochromogenstreifen deutlich zu sehen ist. Porphyrin stört in den Mengen, in denen es unter natürlichen Verhältnissen vorkommt, ebenfalls nicht[1]). Schwefelhämoglobin ist ohne Schwierigkeit durch seinen im Orange auf etwa $\mu\mu$ 619 liegenden Absorptionsstreifen zu erkennen, der bei der Probe mit Schwefelammonium (siehe unten) bestehen bleibt.

Oxyhämoglobin in Mengen, die das Serum rot färben, kann sehr störend wirken; enthält ein solches Serum reichlich Hämatin, so wird das Spektrum seinen Absorptionsstreifen im Rot-Orange aufweisen, der bei Zusatz von Sodalösung bestehen bleibt, dagegen bei der Probe mit Schwefelammonium verschwindet, wobei allerdings ein neuer, schmälerer Streifen des Sulfhämoglobins im Orange auftreten kann. Sorgfältige Beobachtung und Messung gestattet aber die Unterscheidung. Der Nachweis des Hämatins in Gestalt

[1]) Vgl. das Kapitel „Nachweis und Bestimmung von Porphyrin im Blutserum".



des Hämochromogens ist bei so stark oxyhämoglobinhaltigem Serum oft nicht oder nicht sicher zu führen, weil der schmale I. Hämochromogenstreifen in dem breiteren, ungefähr an derselben Stelle liegenden Streifen des aus dem Oxyhämoglobin gebildeten Hämoglobins untergeht oder durch ihn undeutlich gemacht wird. Um die Probe richtig beurteilen zu können, ist es in solchen Fällen oft nötig, die Flüssigkeit nur in geringer, 1 bis 2 *cm* betragender Schichtdicke zu beobachten. Es bedarf größerer Übung und Erfahrung, um Verwechslungen des bei beträchtlichem Oxyhämoglobingehalt auftretenden Streifens des Hämoglobins auf etwa μμ 555 mit einem schwachen ersten Hämochromogenstreifen zu vermeiden. Schwierigen Sera dieser Art mit pathologisch erhöhtem Oxyhämoglobingehalt bin ich wiederholt bei starkem Ikterus, auch bei Fällen von Typhus begegnet. Genaue Messung (Ortsbestimmung)

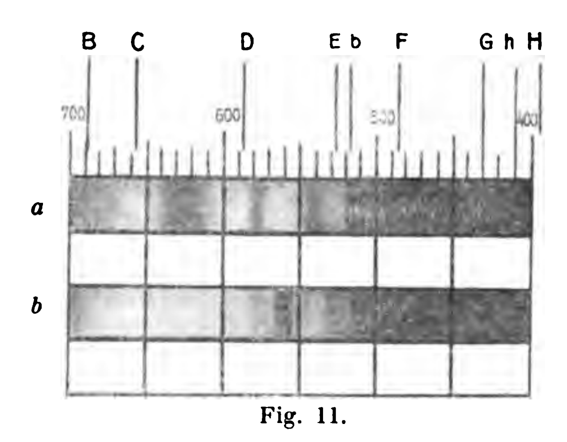


Fig. 11.

des fraglichen Streifens ist in solchen Fällen unbedingt zu verlangen. Den ersten Streifen des Hämochromogens findet man genau oder angenähert auf 559 (vgl. Fig. 11, Spektrum *b*). Er ist symmetrisch, im Verhältnis zu seiner Dunkelheit schmal und gut begrenzt. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß bei genügend hohem Oxyhämoglobingehalt des Serums ein sicheres Urteil über An- oder Abwesenheit von Hämatin in manchen Fällen nicht getroffen werden kann, es sei denn, daß der Hämatingehalt groß genug ist, um einen deutlichen Absorptionsstreifen im Rot-Orange zu liefern.

Methämoglobin beeinträchtigt die Empfindlichkeit des Hämatinnachweises weniger als ein starker Gehalt an Oxyhämoglobin. Methämoglobin gibt ein viel schwächeres Absorptionsbild als Hämochromogen, deshalb läßt sich Hämatin nach Überführung in Hämochromogen bei viel geringerem Gehalt nachweisen als das Methämoglobin. Für die Unterscheidung von Methämoglobin und Hämatin kommt zunächst die Lage des Absorptionsstreifens im

Rot in Betracht. Methämoglobin liefert bei genügendem Gehalt des Serums einen Absorptionsstreifen im Rot auf ungefähr μμ 634. Mischt man einem solchen Serum gesättigte Sodalösung (etwa ein Zehntel Raumteil) hinzu, so verschwindet der Streifen des Methämoglobins im Rot, und statt seiner tritt bei genügendem Methämoglobingehalt der schwache Streifen des alkalischen Methämoglobins im Orange, auf etwa μμ 604, auf, daneben die beiden anderen Streifen des alkalischen Methämoglobins im Gelb und Grün auf etwa 577 und 541. Setzt man ferner zu einer Methämoglobinlösung sehr wenig Schwefelammonium und schüttelt die Flüssigkeit mit Luft, so verschwindet ebenfalls der Methämoglobinstreifen im Rot, die Flüssigkeit zeigt jetzt nur zwei kräftige Streifen im Gelb und Grün. Ist dagegen ein im Rot-Orange bestehender Streifen durch Hämatin bedingt, so verschwindet er bei Zusatz von Sodalösung nicht, wohl aber wenn man die Flüssigkeit der Reduktionsprobe mit Schwefelammonium unterwirft; dabei tritt dann das Hämochromogenspektrum auf. Enthält ein Serum gleichzeitig größere Mengen von Methämoglobin und Hämatin, so zeigt es einen Absorptionsstreifen im Rot, dessen Lage in gewissem Umfange davon abhängig ist, welcher Farbstoff überwiegt. Bei einem Serum, das viel Methämoglobin, daneben eine beträchtliche Menge von Hämatin (Ht 10) enthielt, fand ich den Ort des starken Absorptionsstreifens im Rot auf ungefähr 634. In diesem Falle war also der dem Hämatin eigentümliche Orangestreifen durch den viel stärkeren Methämoglobinstreifen vollkommen übertönt, denn der Ort der stärksten Absorption fiel mit dem für den Methämoglobinstreifen feststehenden (μμ 634) zusammen. Verschiebt sich das Mengenverhältnis der beiden Farbstoffe stark zugunsten des Hämatins, so liefert ein solches Serum einen mehr oder weniger starken, breiten, verwaschenen, unscharf begrenzten Streifen im Rot, dessen Mitte man etwas violettwärts vom Ort des Methämoglobinstreifens (634) z. B. auf 630, 629 oder ähnlich findet. War an dem Streifen im Rot Methämoglobin wesentlich mitbeteiligt, so erfährt er bei Zusatz gesättigter Sodalösung zum Serum eine mehr oder weniger deutliche Abschwächung, verschwindet aber nicht. Ist dagegen neben einer beträchtlichen Menge Methämoglobin Hämatin nur in einem Betrage von etwa Ht 4 bis Ht 6 (vgl. unten) vorhanden, so ist an der Absorption im Rot das Hämatin nicht nennenswert beteiligt, infolgedessen verschwindet in solchem Falle bei Zusatz von Sodalösung der Rotstreifen so gut wie vollständig.

Unter den vielen von mir untersuchten pathologischen Sera mit starkem Hämatingehalt habe ich besonders häufig folgendes Absorptionsbild feststellen können (vgl. Fig. 11, Spektrum *a*): Breiter, verwaschener, unscharf begrenzter Absorptionsstreifen im Rot,

dessen Mitte oft nur angenähert genau feststellbar war und besonders häufig zu μμ 627[1]), öfter auch zu 626 und 625 bestimmt wurde, ferner einen schwachen, schmalen, gut begrenzten symmetrischen Streifen auf 577·5 und einen breiten blauwärts oft nur unscharf begrenzten Streifen auf ungefähr 540, 541 oder 542, der in vielen Fällen stärker war als der zweite, demnach nicht oder nicht lediglich durch Oxyhämoglobin bedingt sein konnte. Wenn der Hämatingehalt unter Ht 8 bis Ht 10 betrug und Methämoglobin fehlte, so war der Absorptionsstreifen im Rot-Orange im allgemeinen nicht mehr deutlich erkennbar; einen schwachen Schatten, die Andeutung seines Rotstreifens, habe ich bei einem Hämatingehalt von Ht 7 bis Ht 8 freilich mehrfach feststellen können. Wenn die Hämatinbestimmung bei einem Serum, das einen deutlichen breiten Streifen im Rot aufweist, nur einen geringen Hämatingehalt ergibt, so ist die gleichzeitige Anwesenheit von Methämoglobin wahrscheinlich. Durch Ausführung der besonderen chemisch-spektroskopischen Methämoglobinproben ist weitere Aufklärung zu schaffen. Serum Kranker mit gleichzeitigem Gehalt an Sulfhämoglobin und Hämatin habe ich noch nicht beobachtet. Der Absorptionsstreifen des Sulfhämoglobins ist, wie schon oben erwähnt wurde, durch seine abweichende Lage bezw. deutlichere Begrenzung von den anderen zu unterscheiden.

Bei der Entnahme und dem Auffangen des Blutes ist mit großer Sorgfalt zu verfahren. Es ist alles zu vermeiden, was zu einer Auflösung von roten Blutkörperchen oder chemischer Veränderung des Blutfarbstoffes führen kann, z. B. Umrühren mit einem scharfkantigen Glasstabe, Verunreinigung mit Spuren von Säuren u. dgl. Ebenso darf das Blut keinerlei Zusatz gerinnungsverhindernder Salze erhalten. Am besten fängt man es unmittelbar im Zentrifugenglas auf, läßt es einige Zeit[2]) (etwa eine halbe bis eine Stunde) stehen, und zentrifugiert es dann. Die Untersuchung erfolgt lediglich in den vorschriftsmäßigen Absorptionsgefäßen, Glaskästen, in denen die vom Licht durchstrahlten Glaswände

[1]) Bei Fällen von Dinitrobenzolvergiftung mit stark positiver Hämatinreaktion fand ich den Absorptionsstreifen im Rot häufig mehr gelbwärts, z. B. auf μμ 620.

[2]) Bei mehrstündigem Stehenlassen pathologischer, hämatinfreier Blutarten bei Zimmertemperatur habe ich in besonderen Versuchen nachträgliche Hämatinbildung noch nicht beobachtet. In vielen Fällen ist selbst eintägiges Stehenlassen bei 10 bis 15° fraglos nicht nachteilig. Wenn demnach auch in vielen Fällen eine Untersuchung an dem ein viertel bis einen Tag alten Blut noch ein eindeutiges Ergebnis liefert, so empfehle ich doch, das Blut frisch, d. h. nach halb- bis einstündigem Stehen zu verarbeiten; bei Infektionskrankheiten erscheint dies sogar unerläßlich, ist doch z. B. von *Eug. Fraenkel* für den von ihm entdeckten Bac. phlegmones emphysematosae nachgewiesen, daß er außerhalb des Organismus (in Blutkulturen) stark hämatinbildend wirkt. Vgl. *Eug. Fraenkel*: Die blutschädigende Wirkung des *Fraenkel*schen Gasbazillus. Deutsche med. Wochenschr. 1919, Nr. 12.

(etwa in den Weiten 2 : 10, Höhe 15 *mm*; 3 : 10, Höhe 15 *mm*; 4 : 10, Höhe 15 *mm*; 5 : 10, Höhe 20 *mm*; 6 : 15, Höhe 20 *mm*; 7 (bezw. 8, bezw. 9) : 15, Höhe 20 *mm*; 8 : 20, Höhe 30 *mm*; 8: 25, Höhe 30 *mm*; 8 : 30, Höhe 30 *mm*; 8 : 35, Höhe 30 *mm*; 8 : 40, Höhe 30 *mm*) eben und parallel sind.

Es kommt nun zunächst darauf an, das Absorptionsspektrum des reinen Serums zu prüfen und festzustellen, ob ein Absorptionsstreifen im Rot vorhanden ist. Um auch einen schwachen Streifen aufzufinden, prüft man es in möglichst großer, wenigstens 4 *cm* betragender Schichtdicke. Man füllt deshalb einen Teil des klar abgegossenen Serums in ein Absorptionsgefäß von 4 *cm* Länge, so daß es darin wenigstens 1 *cm* hoch steht. Dann stellt man Lampe und Kondensor so ein, daß der Spalt des Spektrometers gleichmäßig und möglichst scharf beleuchtet ist, gibt dem Spalt eine Weite von etwa 0·03 *mm*, überzeugt sich, daß das leere Spektrum rein und hell ist und stellt Spektrum und Okularmarke scharf ein. Diese Scharfeinstellung ist (nicht minder wie beim Mikroskopieren) Vorbedingung für eine richtige Beobachtung. Man setzt das Absorptionsgefäß mit dem Serum in Längsrichtung vor den Spalt des Spektrometers, so daß die schmale Wand des Absorptionsgefäßes zur Fläche der Spaltvorrichtung parallel steht und die vom Kondensor ausgehenden mittleren Lichtstrahlen das Serum parallel zur Längswand des Absorptionsgefäßes durchlaufen. Die erforderliche Helligkeit sucht man in erster Linie durch richtige Beleuchtung des Spaltes, also durch richtige Stellung von Lampe und Kondensor zu erreichen, erst in zweiter Linie durch ein etwas weiteres Öffnen des Spaltes, wie das allerdings bei stark opalisierenden und deshalb wenig lichtdurchlässigen Sera notwendig werden kann. Ist ein Absorptionsstreifen im Rot oder Orange sichtbar, so bestimmt man möglichst genau seine Lage durch Einstellung der Okularmarke (des Fadenkreuzes) auf die dunkelste Stelle oder (bei sehr verwaschenen Streifen) auf die Mitte des Streifens. Ist das Serum so wenig lichtdurchlässig, daß eine Beobachtung in 4 *cm* Schichtdicke auch bei etwas größerer Spaltweite (z. B. 0·05 bis 0·06 *mm*) nicht möglich ist, so füllt man es in ein kleineres Absorptionsgefäß um und beobachtet bei geringerer Schichtdicke, z. B. 3, 2 oder 1 *cm*. Man prüft nun das Verhalten des im Rot-Orange aufgefundenen Absorptionsstreifens, indem man das Serum nach den oben erwähnten Gesichtspunkten den chemisch-spektroskopischen Proben auf Methämoglobin und Hämatin unterwirft. Man beginnt mit der Sodaprobe. Wird der Rotstreifen dabei deutlich schwächer oder verschwindet er (Methämoglobin), so prüft man vor allem auf Hämatin, in der gleich genauer zu schildernden Weise und versucht danach, wenn genug Serum vorhanden ist, an einer anderen Probe die Überführung etwa vorhandenen Methämoglobins in

Oxyhämoglobin, indem man dem Serum eine Spur (d. h. ein winziges Tröpfchen) Schwefelammonium oder besser auf etwa 4 *cm*³ Serum einen bis zwei Tropfen fünffach mit Wasser verdünnten Schwefelammoniums zusetzt und stark mit Luft schüttelt. Etwa vorhandenes Methämoglobin erfährt hierbei eine Umwandlung zu Oxyhämoglobin, so daß dessen Spektrum auftritt oder wenn es vorher schon vorhanden war, eine Verstärkung erfährt. Die Deutlichkeit der letztgenannten Erscheinung ist abhängig von der Menge ursprünglich vorhandenen Methämoglobins und Oxyhämoglobins; bei stark überwiegendem Oxyhämoglobingehalt ist ihre Beurteilung schwierig. Die oben kurz erwähnte chemisch-spektroskopische Probe auf Ht führt man folgendermaßen aus. Man füllt ein Absorptionsgefäß von 8:40 oder 10:40 *mm* innerer Weite mindestens 10 *mm* hoch mit Serum, wozu 4 *cm*³ erforderlich sind, überschichtet es mit einer kleinen Menge reinsten Äthers, setzt dem Serum etwa ein Zehntel Raumteil (ungefähr sieben bis acht Tropfen), bei hohem Oxyhämoglobingehalt bis zu ein Fünftel Raumteil auf seine Wirksamkeit geprüftes Schwefelammonium[1]) hinzu, mischt durch mehrmaliges sanftes Umrühren mit einem Glasstab und beobachtet bei 4 *cm* Schichtdicke die eintretende Umwandlung der Spektralerscheinung. Ist Hämatin vorhanden, so bildet sich bald, jedenfalls innerhalb weniger Minuten die Absorptionserscheinung des Hämochromogens. Es hat zwei Absorptionsstreifen, einen schmalen, symmetrischen, scharf begrenzten Streifen auf μμ 559 und einen viel schwächeren, weniger scharf begrenzten Streifen auf ungefähr 527. Der erste Streifen, auf 559, ist noch bei sehr schwachen Hämochromogenlösungen gut zu erkennen und seiner Lage nach genau bestimmbar, während der zweite nur in wesentlich stärkeren Lösungen deutlich erkennbar und meßbar ist. Die Feststellung des ersten Streifens kann bei schwach hämatinhaltigen Seren als genügender Beweis für die Anwesenheit des Hämochromogens und somit des Hämatins gelten, ein anderes Erkennungsmittel ist bislang nicht gefunden; doch sei nochmals auf die Gefahr der Verwechslung mit dem breiteren Streifen des sauerstofffreien Blutfarbstoffes, des Hämoglobins (auf etwa 555) und auf die Notwendigkeit genauester Ortsbestimmung des vermutlichen Hämochromogenstreifens hingewiesen; nur der verhältnismäßig schmale, scharf begrenzte, symmetrische Streifen auf etwa μμ 559 kann als solcher anerkannt werden. Das Hämochromogen wird durch den Luft-

---

[1]) Ich benutze zur Darstellung die offizinelle 10%ige Ammoniakflüssigkeit, in die ich Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung einleite, so daß sich beim Umschütteln des lose, aber dicht verschlossenen Gefäßes im Innern ein Überdruck bemerkbar macht, und stelle zunächst durch Versuche an stark verdünntem Blute und an sehr schwachen Hämatinlösungen fest, ob es brauchbar ist. Mehrere Wochen alt war es durchweg auch noch geeignet.

sauerstoff leicht wieder zu Hämatin oxydiert. Um diese störende Wirkung der Luft auszuschalten, überschichtet man die Flüssigkeit mit Äther. Beim Umfüllen der schon mit Schwefelammonium versetzten Flüssigkeit in ein kleines Absorptionsgefäß findet auch eine Oxydation des Hämochromogens zu Hämatin statt. Man muß deshalb, falls das Umfüllen notwendig ist, nachträglich nochmals etwas Schwefelammonium hinzumischen. Bei stärkerem Oxyhämoglobingehalt beobachtet man nach Zusatz des Schwefelammoniums häufig einen deutlichen, ziemlich schmalen Absorptionsstreifen im Rot-Orange auf etwa $\mu\mu$ 619; er gehört dem durch Einwirkung des Schwefelammoniums auf das Oxyhämoglobin entstandenen Sulfhämoglobin an, ist somit für die Hämatinprobe ohne Bedeutung.

Führt man die Untersuchung mit dem beschriebenen Gitterspektrometer meiner Konstruktion aus, und ist dabei der erste Streifen des Hämochromogens auf 559 bei 4 *cm* Schichtdicke noch eben zuverlässig erkennbar und seiner Lage nach bestimmbar, so bezeichne ich den Gehalt an Hämatin mit „Ht 1". Die Schichtdicke von 4 *cm* habe ich als Grundmaß gewählt und beibehalten, weil nach meinen Erfahrungen weitaus die meisten Sera in dieser Schichtdicke noch genügend Licht durchlassen, um bei ihnen die Probe regelrecht ausführen zu können. Zu den Ausnahmen gehören gewisse stark opalisierende Sera, wie ich sie z. B. häufig bei Malaria, aber auch bei perniziöser Anämie und einigen anderen Krankheiten beobachtet habe.

Bestimmung des Gehaltes an Hämatin.

Überführt man in Mischungen aus normalem, praktisch als „oxyhämoglobinfrei" zu betrachtendem Blutserum und wässeriger Blutkörperchenlösung das Oxyhämoglobin durch geeignete Behandlung mit Kalilauge in Hämatin oder stellt man aus oxyhämoglobinfreiem Serum durch Zusatz von einem Zehntel Raumteil passend verdünnten, aus Blut durch Behandeln mit Kalilauge in der Wärme gewonnenen Hämatinlösungen, hämatinhaltiges Blutserum her, so liefert dieses bei der Probe mit Schwefelammonium noch ein durch beide Absorptionsstreifen gekennzeichnetes Hämochromogenspektrum, wenn der Hämatingehalt der Mischung ungefähr einer Verdünnung von 1 Teil normalen Blutes auf 3000 Teile Wasser (= 0·033%) entspricht, und man die Probe bei 4 *cm* Schichtdicke mit dem Gitterspektrometer oder einem Prismenspektrometer der oben gekennzeichneten Art untersucht. Bei einer Verdünnung von 1: 4000 und Untersuchung in 4 *cm* Schichtdicke ist der erste Hämochromogenstreifen seiner Lage nach noch bestimmbar, der

zweite dagegen nur noch angedeutet, bei 1:5000 ist nur der erste Streifen eben noch meßbar. Diese Feststellungen gelten für ganz klares, nicht opalisierendes Serum. Mein im Jahre 1913 veröffentlichtes[1]) und etwas vorsichtig gefaßtes Urteil über die Empfindlichkeit der Probe bei pathologischen Sera möchte ich auf Grund oft wiederholter Untersuchungen dahin ergänzen, daß die Empfindlichkeit bei schwach gefärbten, nicht opalisierenden Sera durchweg wohl noch etwas größer angenommen werden kann und ein einer Blutverdünnung von 1:4000 (= 0·025%) entsprechender Hämatingehalt unter günstigen Bedingungen noch als nachweisbar gelten darf. Rechnet man die aus 100 *g* normalen Blutes darstellbare Menge Hämatin zu etwa 0·55 *g*, so wäre bei Beobachtung in 4 *cm* Schichtdicke im Serum ein wahrer Hämatingehalt von 0·14 *mg* in 100 *g* Blut nachweisbar. Ich habe den bei der Beobachtung in 4 *cm* Schichtdicke durch die Hämochromogenprobe gerade noch nachweisbaren Hämatingehalt als „Ht 1" bezeichnet, Ht 4 bedeutet demnach positiven Ausfall der Hämochromogenprobe bei nur 1 *cm* Schichtdicke, Ht 10 positiven Ausfall noch bei 4 *mm* Schichtdicke. So läßt sich durch Bestimmung der Schichtdicke, in der das Serum nach der Reduktion mit Schwefelammonium den ersten Streifen des Hämochromogens auf 559 gerade noch deutlich meßbar zeigt, die erforderliche Unterlage für eine Schätzung des Hämatingehaltes gewinnen.

Ich habe mich im allgemeinen damit begnügt, den Hämatingehalt einfach durch die Angabe dieser relativen Zahlenwerte zu kennzeichnen. Um aus diesen Zahlen den Hämatingehalt in Milligramm für 100 cm^3 Blutserum zu erhalten, braucht man nur für Ht 1 zu setzen 0·14 *mg* in 100 cm^3 Blutserum, „Ht 30" bedeutet demnach 4·2 *mg*, Ht 50 7 *mg* in 100 cm^3 Blutserum. Derartig hohe Werte habe ich u. a. bei Vergiftungen mit Dinitrobenzol gefunden[2]), Mengen von 3 bis 4 *mg* bei Sepsis durch den *Fraenkel*schen Bac. phlegmones emphysematosae und bei extrauteriner Schwangerschaft, Mengen von 0·14 bis 2·8 *mg* bei einigen der an anderer Stelle besprochenen Krankheiten[3]). Eine Angabe von *J. Feigl* über ein nur bräunlich-

---

[1]) Die Empfindlichkeit des qualitativen Nachweises von Hämatin schwankt je nach der größeren oder geringeren Durchsichtigkeit des Blutserums und dem Gehalt an anderen Farbstoffen. Unter günstigen Umständen dürfte durch die Probe mit Schwefelammonium bei der Beobachtung des Serums in 4 *cm* Schichtdicke eine etwa 0·035% Blut entsprechende Menge Hämatin noch nachweisbar sein. Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 179 (1913) (Über den Nachweis von Hämatin im menschlichen Blutserum).

[2]) Mitgeteilt in der Abhandlung von *O. Olsen*: Über Dinitrobenzolvergiftung. Med. Klin. 1918, Nr. 24.

[3]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 32 (1916); ferner *Brüll* und *O. Schumm* l. c.

gelbes Serum, dessen Hämatingehalt er zu „1·5% freies Ht im Blute“ schätzt[1]), beruht ersichtlich auf einem Druckfehler oder Rechenfehler. Bei sehr hohem Hämatingehalt (über Ht 15 bis 20) verdünne ich das Serum zuvor mit der zwei- bis fünffachen Menge Wasser und führe dann die Bestimmung aus. Bei Anstellung der Probe in geringer Schichtdicke ist dafür zu sorgen, daß das Spektrum nicht übermäßig hell ist, damit die Empfindlichkeit des Auges nicht verringert wird. Die richtige Helligkeit wird durch Verschieben der Kondensorlinse erzielt.

Ein zweites Verfahren[2]) besteht darin, daß man in einer abgemessenen Menge Blut den Blutfarbstoff durch Behandlung mit Kalilauge in Hämatin überführt und daraus passende Verdünnungen herstellt, diese unter genau gleichen Versuchsbedingungen gleichzeitig mit dem Serum der Reduktion mit Schwefelammonium unterwirft und durch vergleichend spektroskopische bezw. spektrokolorimetrische Prüfung den relativen Hämatingehalt ermittelt. Am besten stellt man unmittelbar die Verdünnungsstufe fest, bei der die aus Blut künstlich hergestellte Hämatinlösung und das reduzierte Serum bei gleicher Schichtdicke den ersten Absorptionsstreifen des Hämatins in gleicher Stärke zeigen. Diese Art der Bestimmung erfordert einen Spektralapparat, der die gleichzeitige Beobachtung zweier Flüssigkeitsspektra unter richtigen optischen Bedingungen gestattet, z. B. das von mir beschriebene Präzisionsspektroskop mit horizontaler Spaltlage[3]) oder einen gleichwertigen Apparat ähnlicher Konstruktion.

*

Anmerkung 1. Der Nachweis von Hämatin in den Blutkörperchen ist durch deren hohen Gehalt an Oxyhämoglobin sehr erschwert und vorläufig wohl nur so zu führen, daß man durch spektroskopische Prüfung eines Auszuges der Blutkörperchen mit Sodalösung den Absorptionsstreifen des Hämatins im Rot-Orange festzustellen sucht.

Anmerkung 2. Die Farbe hämatinhaltiger Sera ist sehr verschieden, je nachdem sie an färbenden Bestandteilen überwiegend oder fast ausschließlich Hämatin oder aber Gemische aus Hämatin mit größeren Mengen anderer Farbstoffe enthalten. Im ersten Falle sind die Sera mehr oder weniger stark bräunlich-gelb bis braun, im zweiten je nach der Art und Menge der anderen Farbstoffe (Oxyhämoglobin, Methämoglobin, Bilirubin) mehr rötlich oder

[1]) *J. Feigl*: Neue Beobachtungen über das Vorkommen von Hämatin im menschlichen Blutserum. III. Biochem. Zeitschr. **93**. 121 (1918).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**. 179.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**. 304 (1910).

mehr gelb. Bilirubin bewirkt schon in mäßiger Menge eine mehr gelbe Tönung hämatinhaltiger Sera. Ich habe sogar wiederholt (z. B. bei perniziöser Anämie) Sera beobachtet, die trotz ihres beträchtlichen Hämatingehaltes (z. B. bei Ht 4 bis Ht 6) durch Bilirubin rein und stark gelb gefärbt waren. Demnach läßt sich aus der Farbe der Sera kein sicherer Schluß auf die An- oder Abwesenheit von Hämatin ziehen.

Einfache Eiweißstoffe, Proteine.

A. Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt.

Von **Thomas B. Osborne**, New-Haven, Connecticut, U. S. A.
und **E. Strauss**, Frankfurt a. Main.

EINLEITUNG.

Im folgenden werden die Methoden zur Darstellung der am genauesten untersuchten Proteine des Pflanzenreiches, der Samenproteine, geschildert.

Die Samenproteine können in die folgenden Gruppen eingeteilt werden:

I. Einteilung der Samenproteine.

1. Globuline.

Weitaus der größte Teil der Samenproteine zeigt die Löslichkeitsverhältnisse, die gewöhnlich als charakteristisch für die Globuline gelten, d. h. sie sind unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen.

Diese Samenglobuline stimmen, was ihre Fällungsverhältnisse durch Ammonsulfat betrifft, mit der gebräuchlichen Definition eines Globulins nicht überein, denn während einige schon bei halber oder noch weniger starker Sättigung mit diesem Salz ausfallen, werden andere nicht gefällt, bis ihre Lösung beinahe vollständig gesättigt ist.

Bei der Darstellung von Samenglobulinen muß berücksichtigt werden, daß viele nur dann die charakteristische Löslichkeit der Globuline zeigen, wenn sie mit einer sehr geringen Menge Säure zu Proteinsalzen verbunden sind. Wenn diese Säure durch Neutralisation ganz entfettet wird, ist das Protein vollständig löslich in Wasser. In den folgenden Seiten werden solche Proteinsalze als Globuline behandelt werden, denn die bei der Extraktion der Samen erhaltenen Proteine werden fast immer als Proteinsalze isoliert,

2. Prolamine.

Mit dem Namen „Prolamine“ soll jene wohl charakterisierte Gruppe von Eiweißkörpern bezeichnet werden, die durch Extraktion der Samen der Zerealien mit Alkohol von 50 bis 80 Volumprozenten erhalten werden.

Dieser Name zeigt an, daß diese Proteine verhältnismäßig große Quantitäten von Prolin und Amidstickstoff liefern, wenn sie mit Säuren zersetzt werden. In den Samen von allen bis jetzt untersuchten Zerealien, Reis ausgenommen, wird verhältnismäßig viel Prolamin gefunden. Die Prolamine sind nicht bloß durch ihre Löslichkeitsverhältnisse und ihre physikalischen Eigenschaften charakterisiert, sondern auch durch ihre Abbauprodukte, da sie alle sehr wenig Arginin und Histidin, viel Prolin, Ammoniak, Glutaminsäure und kein Lysin liefern.

3. Gluteline.

Diese Proteine sind unlöslich in allen neutralen Lösungsmitteln und können aus den Samen nur mit verdünnten Alkalien oder Säuren extrahiert werden.

Das Glutenin odes Glutenkasein des Weizens ist das beste Beispiel dieser Gruppe. Andere ähnliche Proteine existieren wahrscheinlich auch in den Samen anderer Zerealien, aber von ihnen ist wenig bekannt infolge der großen Schwierigkeit, sie in annähernd reinem Zustande zu isolieren.

In anderen Samen als den der Zerealien bleibt auch nach wiederholter Extraktion mit den verschiedenen neutralen Lösungsmitteln Stickstoff im unlöslichen Rückstande des Mehles zurück. Ein Teil dieses Stickstoffes gehört zweifellos zu den Proteinen, welche in den unverletzten Zellen zurückgeblieben und daher den neutralen Lösungsmitteln nicht zugänglich sind. Ein anderer Teil dieses Stickstoffes jedoch kann mit verdünnten alkalischen Lösungen extrahiert werden und gehört wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grade Verbindungen der löslichen Proteine mit anderen Bestandteilen des Samens, z. B. mit Nukleinsäure, an. Es ist noch unsicher, ob etwas von diesem Stickstoff zu Proteinen gehört, welche einen anderen Charakter besitzen als die durch die neutralen Lösungsmittel extrahierten Eiweißstoffe, oder ob zu Proteinen, die ähnliche Eigenschaften wie die Zerealiengluteline besitzen, denn die durch Alkali extrahierten und durch Neutralisation gefällten Produkte sind zu unrein, um bestimmte, sie betreffende Schlüsse zu rechtfertigen.

4. Albumine.

Fast alle Samen enthalten 0·1 bis 0·5% wasserlösliche, durch Hitze koagulierbare Proteine, welche die wesentlichen Eigenschaften

der animalischen Albumine besitzen. Viele von diesen Samen albuminen werden aus ihren Lösungen vor Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt.

5. Proteosen.

Beinahe alle Samen, die mit Wasser oder Salzlösung extrahiert werden, liefern eine kleine Quantität von Proteinen mit Eigenschaften, die gewöhnlich als charakteristisch für die durch Einwirkung von Fermenten auf tierische Proteine entstehenden Proteosen betrachtet werden. Proteosen, die in den Eigenschaften mit den Proto-, Deutero- und Heteroproteosen übereinstimmen, sind in kleinen Quantitäten aus Samen erhalten worden. Es ist nicht sicher, ob diese Proteosen ursprüngliche Bestandteile des Samens sind oder ob sie durch enzymatische Wirkung während der Extraktion entstehen[1]). Die Gesamtquantität von den aus den Samen erhältlichen Proteosen übersteigt selten einige Hundertstel von einem Prozent. Diese Gattung von Proteinen, falls sie wirklich ursprüngliche Bestandteile des Samens sind, kommt wahrscheinlich hauptsächlich im Embryo vor, da verhältnismäßig große Quantitäten aus dem Weizenembryo erhalten worden sind[2]).

Da diese Proteosen in sehr kleinen Mengen vorkommen und ihr Ursprung unsicher ist, und da sie ferner in verschiedenen Formen existieren, ist kein Versuch gemacht worden, besondere Methoden zu ihrer Darstellung auszuarbeiten. Zu ihrer Isolierung werden die gleichen Methoden angewandt, die zur Darstellung und Trennung der tierischen Proteosen dienen.

II. Chemischer Charakter der Proteinpräparate.

Es ist wichtig, so genau als möglich von einem chemischen Standpunkt aus den Charakter der hier beschriebenen Präparate von Proteinen zu bestimmen. Da keine physikalischen Eigenschaften existieren, durch welche die chemische Individualität einer Proteingattung festgestellt werden kann, ist es unmöglich, zu entscheiden, ob die hier beschriebenen Präparate einheitliche chemische Individuen oder Gemische von zwei oder mehr einander ähnlichen Proteinen sind.

Die Proteine sind amphotere Substanzen und sind, wenn sie nicht aus chemisch neutralen Lösungen isoliert werden, je nach den Fällungsverhältnissen mit geringen Quantitäten von Basen oder

---

[1]) cf. *Vines*: The Proteases of Plants. IV. Annals of Botany. **20.** 113 (1906) und Proteases of plants. IV. Ibid. **22.** 103 (1906); *Dean*: On Proteolytic Enzymes. I. Botanical Gazette. **39.** 321 (1908).

[2]) cf. *Osborne* and *Campbell*: The Nucleic Acid of the Embryo of wheat and its Protein Compounds. Journ. of the Amer. Chem. Soc. **22.** 379 (1900).

Säuren verbunden. Es ist praktisch unmöglich, die Bedingungen bei der Darstellung der meisten Proteine so zu wählen, daß die Bildung solcher Proteinverbindungen[1]) vermieden wird, und da die Samenproteine aus schwach sauren Extrakten dargestellt werden, so sind die zu beschreibenden Proteine zweifellos Mischungen von Proteinsalzen derjenigen Säuren, die in der Lösung, aus der die Proteine zuletzt erhalten wurden, zugegen waren.

Eine weitere Schwierigkeit bietet der Umstand, daß die einzelnen Proteine bei der Darstellung Veränderungen erleiden können, die ihre Eigenschaften, z. B. ihre Löslichkeit, beeinflussen. So kann in manchen Fällen ein Teil des Proteinniederschlages im ursprünglichen Lösungsmittel ungelöst bleiben.

Diese Umwandlung, welche zur Bildung unlöslicher Produkte führt, die als Proteane bezeichnet werden mögen, scheint in den meisten Fällen durch die hydrolytische Wirkung[2]) der vorhandenen Säuren veranlaßt zu sein und kann gewöhnlich zum großen Teil vermieden werden, wenn die Menge freier Säure im Extrakt sehr gering ist. Es ist jedoch in vielen Fällen schwierig oder unmöglich, die Gegenwart einer kleinen Menge dieser unlöslichen Produkte in den Proteinpräparaten auszuschließen.

Die Möglichkeit von Umwandlungen, welche die Proteine durch die Samenfermente erleiden können, verdient ebenfalls Beachtung. Das Vorkommen proteolytischer Fermente in vielen Samen ist wohl bekannt und es ist wahrscheinlich, daß in vielen Fällen die Isolierung der Proteine hiedurch beeinträchtigt wird[3]). Solche Umwandlungen beeinflussen wahrscheinlich eher die Ausbeute der zu beschreibenden Proteine als ihren Charakter, denn alle bekannten Produkte der primären Einwirkung proteolytischer Enzyme sind viel löslicher in Wasser als die hier beschriebenen Präparate.

Diese Präparate stellen Produkte dar, die, wie durch sukzessive fraktionierte Fällung erwiesen wurde, konstante Zusammensetzung und einheitliche physikalische Eigenschaften besitzen. Soweit letztere mit den zur Verfügung stehenden Mitteln bestimmt werden konnten, ist bis jetzt kein Anzeichen vorhanden, daß die Präparate Mischungen zweier oder mehrerer Proteine sind. Daß sie bestimmte chemische Substanzen im Sinne des organischen Chemikers sind,

[1]) cf. *Osborne*: Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säuren und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 240 (1901).

[2]) *Osborne*: Ein hydrolytisches Derivat des Globulins Edestin und sein Verhältnis zu *Weyls* Albuminate und zur Histongruppe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 225 (1901); derselbe: A Hydrolytic Derivative of the Globulin Edestin and its relations to *Weyls* Albuminate and the Histon Group. Journ. Amer. Chem. Soc. **24**. 28 (1902).

[3]) *Vines*: The Proteoses of Plants. IV. Annals of Botany. **20**. 113 (1906) und The Proteoses of Plants. V. Ibid. **22**. 103 (1908).



ist wohl kaum anzunehmen. Man kann vorläufig nur sagen, daß die meisten von ihnen wohldefinierte, individuelle Proteine mit ganz bestimmten Eigenschaften darstellen und daß man dieselben Eiweißstoffe mit den gleichen Methoden immer wieder erhält.

III. Allgemeine Methoden zur Darstellung von Samenproteinen.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß durch andere als die hier beschriebenen Methoden in vielen Fällen ebenso gute oder bessere Resultate erhalten werden können, aber in Übereinstimmung mit dem Zwecke dieses Werkes werden nur diejenigen Methoden angegeben, die sich in der bisherigen Praxis als befriedigend erwiesen haben. Es ist z. B. wahrscheinlich, daß in vielen Fällen Zentrifugieren vorteilhaft an Stelle der Filtration angewendet werden kann, besonders wenn man mit kleinen Mengen arbeitet. Da bei der Darstellung verschiedener Proteine dieselben Operationen wiederholt angewendet werden, ist in diesem Abschnitte die detaillierte Beschreibung der gemeinsamen Operationen angegeben und darauf bei der Beschreibung der Darstellung der einzelnen Proteine durch Zahlenhinweis Bezug genommen.

A. Das Mahlen der Samen.

Um Samen zur Extraktion zuzubereiten, ist es nicht bloß wichtig, sie fein zu mahlen, sondern auch ihre Schalen und Samenhäute zu entfernen. Diese enthalten nämlich gewöhnlich Farbstoffe und häufig Tannin, Phytin usw. — Stoffe, die in der Folge die Proteinpräparate verunreinigen würden.

Bei ölarmen Samen wird die äußere Hülle in geeigneten Mühlen durch einen allmählichen Zerkleinerungs- und Siebeprozeß entfernt — im wesentlichen durch das vom Müller angewandte Verfahren zur Herstellung des Weizenmehles.

Bei ölreichen Samen wird das Verfahren der Zerkleinerung dadurch erschwert, daß sich beim Mahlen eine Paste bildet, welche die Mühle verstopft. Man kann dies vermeiden, indem man die Samen mit ungefähr einem Drittel ihres Volumens Kerosinöl mischt, bevor man sie in die Mühle bringt. Das beim Mahlen sich bildende Gemisch ist eine dünne Paste, welche nach grobem Zerkleinern mit Petroläther extrahiert oder in einer hydraulischen Presse ausgepreßt wird. Der mehlige Rückstand wird dann gesiebt, um die größeren Teile der äußeren Samenhäute zu entfernen. Diese werden noch einmal gemahlen und, wenn nötig, noch einmal gesiebt.

G r o ß e ö l r e i c h e Samen, wie Nüsse, können nach Entfernung der Schalen am besten in einer Fruchtpresse („Saftmühle") zerkleinert werden. Hiebei werden die Samen auch zum größten Teile vom Öl befreit; der Rest desselben kann durch Petroläther leicht extrahiert werden.

B. Extraktion des Mehles.

Während des Extraktionsprozesses und bei allen zur Isolierung und Reinigung der Proteine erforderlichen Operationen ist es absolut nötig, die Lösung vor der Entwicklung von Organismen zu schützen. Dies kann durch eine reichliche Anwendung von Toluol, das häufig erneuert und mit der Lösung gut gemischt werden muß, erreicht werden. In der folgenden Beschreibung der verschiedenen Prozesse bei der Darstellung von Proteinpräparaten ist vorausgesetzt, daß Toluol in dieser Weise zugefügt wurde. Dies wird weiterhin nicht mehr erwähnt werden.

1. M e n g e d e s L ö s u n g s m i t t e l s.

Die Menge des erforderlichen Lösungsmittels muß so groß sein, daß mindestens 3 Viertel des verwendeten Quantums in filtrierbarer Form vorliegt. Die Menge hängt demnach von der absorbierenden Kraft des Mehles ab. Die geeignete Quantität wird darum in den Darstellungsmethoden der einzelnen Proteine angegeben werden.

Die beschriebenen Methoden sind zur Darstellung relativ großer Proteinmengen berechnet. Die Menge des Lösungsmittels ist der Bequemlichkeit halber so klein als möglich gewählt. Wenn kleinere Mengen von Mehl möglichst vollständig extrahiert werden sollen, so ist eine entsprechend große Menge des Lösungsmittels erforderlich.

2. D a u e r d e r E x t r a k t i o n.

Fein zerteilte Samenproteine lösen sich sehr schnell auf, wenn sie mit dem geeigneten Lösungsmittel digeriert werden. Es ist deshalb nicht ratsam, die Extraktion über die Zeit hinaus auszudehnen, welche nötig ist, um alle Partikel des fein zermahlenen Materials mit dem Lösungsmittel in unmittelbare Berührung zu bringen. Es genügt kurz dauerndes, aber tüchtiges Durchrühren.

Da die Samenextrakte beim Stehen gewöhnlich, wenn nicht immer, sauer werden und da die Samenfermente wahrscheinlich Umwandlungen in den Proteinen verursachen, ist es wichtig, mit wässerigen Lösungsmitteln die Extraktion so schnell wie möglich durchzuführen und lieber auf die Vollständigkeit der Extraktion zu verzichten, als Veränderungen oder Verluste des Proteins zu riskieren.

Die Trennung des Extraktes vom ungelösten Material wird daher sofort nach dem Mischen mit dem Lösungsmittel vorgenommen; denn die Zeit, die zu dieser Trennung und dem nachfolgenden Waschen des unlöslichen Rückstandes nötig ist, genügt vollständig, um eine praktisch vollständige Lösung alles löslichen Proteins zu erzielen.

C. Filtration des Extraktes.

Erfolgreiche Filtration des Extraktes und der Lösungen der Proteine ist von grundlegender Bedeutung bei der Darstellung von Proteinpräparaten. Richtige Präparate können nicht erhalten werden, wenn ihre Lösungen nicht gänzlich frei von unlötlichen Substanzen sind. Zur Erreichung dieser Resultate sind daher die folgenden Methoden ausführlich angegeben.

1. Leicht filtrierbare Extrakte.

Die Mischung von Mehl und Lösungsmitteln wird sofort auf ein genügend feinmaschiges Tuch geworfen, um den größeren Teil des unlöslichen Rückstandes zurückzuhalten. Wenn der größte Teil des Lösungsmittels durchgelaufen ist, wird der Rückstand in einer starken Presse ausgedrückt. Dieser Rückstand kann nicht ausgepreßt werden, wenn er zu viel Lösungsmittel enthält. Dieses muß daher größtenteils entfernt werden, bevor man versuchen darf, den Rückstand unter die Presse zu bringen. Es ist Erfahrung nötig, um den richtigen Moment festzustellen.

Die *Buchner*sche hydraulische Presse ist zum Auspressen von Samenrückständen gut geeignet, doch kann auch eine starke Schraubenhandpresse vorteilhaft angewandt werden. Der Preßrückstand muß dann noch einmal durch eine Wiederholung des vorigen Prozesses gewaschen und das Extrakt sofort durch eine dicke Schicht von Papierbrei auf einem *Buchner*schen Porzellantrichter filtriert werden.

Diese Schicht von Papierbrei kann leicht hergestellt werden, indem man in einem großen Gefäß Filtrierpapierstücke und destilliertes Wasser mischt und das nasse Papier mit der Hand zu einem feinen Brei zerteilt. Man muß so viel Papier anwenden, daß man nachher eine halbfeste Masse bekommt.

Um mit diesem Brei ein Filter zu machen, wird so viel in einen *Buchner*-Trichter gefüllt, daß er ohne Anwendung der Saugpumpe bis oben gefüllt ist. Der Trichter wird dann mit einer guten Saugvorrichtung verbunden. Während des Saugens wird der Brei mit der Hand gut zusammengepreßt, bis daraus durch die Saug- und Druckwirkung nur noch wenig Wasser entfernt wird. Es ist

vorteilhaft, wenn die Oberfläche des Filters leicht konkav ist, so daß es an den Seitenwänden des Trichters etwas dicker ist, denn während der Filtration verursacht der unlösliche Rückstand einen vermehrten Druck auf das Filter, welcher ein allmähliches Schrumpfen der Filterschicht an den Rändern des Trichters bewirkt. Während der Filtration muß der Filterrand deshalb sorgfältig niedergepreßt werden. Die Filterschicht muß vor der Filtration vollständig mit dem zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel ausgewaschen werden.

Mit einer guten Saugpumpe können die meisten Samenextrakte auf diese Weise verhältnismäßig rasch und sehr vollständig filtriert werden. Wenn die Filtration infolge Verstopfung des Filters langsam wird, kann die Oberfläche mit einem passenden Instrument aufgekratzt und die Filtration beschleunigt werden. Wenn nach einiger Zeit die Filtration auch durch Aufkratzen nicht mehr beschleunigt werden kann, wird das Filter entfernt, in einer frischen Menge des Lösungsmittels gewaschen und in einer hydraulischen oder Handpresse ausgepreßt. Der Rest des Extraktes und die Waschwässer müssen dann durch ein neues Filter filtriert werden.

Diese Filtrationsmethode der Proteinlösungen hat sich als sehr empfehlenswert erwiesen. Wenn richtig gehandhabt, können verhältnismäßig große Flüssigkeitsmengen schnell filtriert und viel klarer erhalten werden als auf irgendeinem anderen bis jetzt versuchten Wege. Diese Filtrationsmethode empfiehlt sich nicht, um große Quantitäten unlöslicher Stoffe zu entfernen; besser wird die Hauptmenge derselben durch Absetzen und Durchgießen durch ein Tuch weggeschafft. Die so erhaltene Lösung ist dann für die oben beschriebene Filtration geeignet. Ein wenig Erfahrung mit dieser Methode wird dem Experimentator bald zeigen, wann und wie er sie anwenden soll.

2. Extrakte von an Stärke reichen Samen.

Extrakte von stärkereichen Samen können nach dem Seihen durch ein Tuch nicht filtriert werden, bis der größere Teil der Stärke sich gesetzt hat, denn die Stärkekörner sind so klein, daß ein großer Teil derselben durch das Koliertuch geht.

3. Gummistoffe enthaltende Extrakte.

Samenextrakte, die viel Gummistoffe oder sonst das Filter leicht verstopfende Stoffe enthalten, werden am besten so behandelt, daß man zum Extrakt eine große Menge in kleine Stücke zerrissenes Filtrierpapier gibt und das Papier mit einem Glasstab oder mit der Hand zu einem Brei zerkleinert.

Die angewandte Papiermenge sollte genügend sein, um alle Flüssigkeit zu absorbieren und eine halbfeste Masse zu bilden, die

dann in ein Tuch gebracht und mit einer starken Hand- oder hydraulischen Presse ausgedrückt wird. Bei großem Druck ist der Verlust gering und das Extrakt wird gewöhnlich so frei von unlöslichen Bestandteilen erhalten, daß es schnell vollständig klar durch eine Schicht von Papierbrei filtriert werden kann.

D. Fällung.

1. Durch Neutralisation.

Fast alle Samenproteine werden aus alkalischer oder saurer Lösung gefällt, wenn ihre Reaktion schwach sauer gemacht wird. Der Niederschlag besteht aus einem Proteinsalz der Säure. Der Betrag dieser gebundenen Säure ist sehr klein. Beim Neutralisieren solcher Lösungen darf Phenolphthalein nicht angewandt werden, denn dieser Indikator zeigt einen Überschuß von Säure erst dann an, wenn die mit dem Protein verbundene Säure vollständig neutralisiert ist. Lackmus ist der beste Indikator für diese Fällungsmethode der Sameneiweißkörper, denn die Fällung aus saurer Lösung beginnt gewöhnlich, wenn die Reaktion gegen Lackmus schwach sauer wird. Auch die Fällung aus alkalischer Lösung ist vollständig, wenn dieser Säuregrad erreicht ist.

2. Durch Dialyse.

Die Dialyse großer Flüssigkeitsmengen wird in einer der bekannten (im ersten Teil dieses Handbuches) beschriebenen Anordnungen vorgenommen. Toluol ist von Zeit zu Zeit zuzufügen.

3. Durch Alkohol.

Fällung mittels Alkohols kann häufig angewendet werden, um Samenproteine aus ihren wässerigen Lösungen zu trennen. Wenn das Flüssigkeitsvolumen groß ist, wird die Fällung am besten bewerkstelligt, indem man die wässerige Lösung gegen ungefähr das gleiche Volumen Alkohol dialysiert. Da das Wasser rasch in den Alkohol diffundiert, wird die Proteinlösung konzentriert und die zur vollständigen Fällung des Proteins nötige Menge Alkohol ist auf diese Weise verhältnismäßig klein.

4. Durch Neutralsalze.

Ammoniumsulfat ist das einzige Salz von praktischer Bedeutung, das zur Fällung von Samenproteinen angewendet worden ist. Es wird vorteilhaft verwendet, um kleine Quantitäten von Proteinen von großen Flüssigkeitsvolumina zu trennen, so daß sie wieder in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen aufgelöst werden können.

Mittels fraktionierter Fällung durch Ammonsulfat können auch viele Proteine schnell und leicht voneinander getrennt werden.

Die Erfahrung hat bei den Samenproteinen gezeigt, daß die Fällungsgrenzen, die *Hofmeister* und seine Schüler als charakteristisch für jedes Protein betrachteten, nicht so exakt sind, wie allgemein geglaubt worden ist[1]). Die Grenzen, zwischen denen die Fällung erfolgt, sind in weiten Grenzen abhängig von der Behandlung, der das Protein vorher unterworfen worden ist. So wurde gefunden, daß der innerhalb bestimmter Grenzen im Samenextrakt gebildete Niederschlag innerhalb weiterer Grenzen und bei niedrigerer Sulfatkonzentration gefällt wurde, wenn er vorher gelöst und durch Dialyse wiedergefällt worden war. Gleichwohl ist diese Methode sehr erfolgreich bei der Trennung vieler Proteine.

Das jeweilige Verfahren wird für jeden einzelnen Fall in der detaillierten Beschreibung der Fällungsmethode angegeben werden.

Um die Erzeugung einer Lösung von gegebener Ammonsulfatkonzentration aus einem gegebenen Volumen von bekannter niedrigerer Konzentration zu erleichtern, sei folgende Tabelle angegeben.

Tabelle mit der in Grammen angegebenen Ammonsulfatmenge, welche zu jedem Liter einer Lösung von der angegebenen Konzentration zugefügt werden muß, um eine Lösung von bestimmter, höherer Konzentration zu erzielen.

Ursprüngliche Sättigung	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
0·0	76·0	152·0	228·0	304·0	380·0	456·0	532·0	608·0	684·0	760·0
0·1	—	73·5	146·9	220·4	293·8	367·3	440·8	514·2	587·7	661·1
0·2	—	—	70·4	140·7	211·1	281·5	351·9	422·2	492·6	563·0
0·3	—	—	—	67·9	135·7	203·6	271·4	339·3	407·1	475·0
0·4	—	—	—	—	65·5	131·0	196·5	262·0	327·5	393·0
0·5	—	—	—	—	—	63·3	126·7	189·0	253·3	316·7
0·6	—	—	—	—	—	—	61·3	122·6	183·9	245·2
0·7	—	—	—	—	—	—	—	59·4	118·7	178·1
0·8	—	—	—	—	—	—	—	—	57·6	115·2
0·9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	55·9

Beim Gebrauch dieser Tabelle ist es notwendig, den durch das gelöste Protein ausgeübten Einfluß auf das Volumen der Lösung zu vernachlässigen. Er kommt nur für konzentrierte Lösungen in Betracht. Die Anwendung dieser Tabelle sei an folgendem Beispiel erklärt:

Ein Extrakt wird dargestellt, indem man 1 *kg* Samenmehl mit 3 *l* einer Lösung behandelt, die 2 Zehntel der zur völligen Sättigung nötigen Ammonsulfatmenge, d. h. 152 *g* des Salzes in 1 *l* Wasser, enthält. Von diesem Extrakt werden nach der Filtration 2 *l* erhalten,

[1]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25.** 837 (1903). Ferner *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Proteins, Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. **13.** 436 (1905).

die auf 4 Zehntel-Sättigung gebracht werden müssen. 1 *l* der 2 Zehntel gesättigten Lösung braucht nach der Tabelle 140·7 *g* Sulfat, um sie 4 Zehntel gesättigt zu machen, daher brauchen die beiden Liter des Extraktes 281·4 *g*. Diese Methode, die Sulfatkonzentrationen herzustellen, ist verschieden von *Hofmeisters* Methode, bei der die Konzentrationen durch die Anzahl Kubikzentimeter gesättigter Lösung in einem Volumen von 10 cm^3 angegeben wird.

Durch *Hofmeisters* Methode wird eine 5 Zehntel gesättigte Lösung hergestellt mit 5 cm^3 der Proteinlösung und 5 cm^3 der gesättigten Sulfatlösung. Dies gibt jedoch keine Lösung, die wirklich 5 Zehntel gesättigt ist, wie durch das folgende Beispiel gezeigt wird.

100 cm^3 gesättigter Sulfatlösung enthalten 71·5 cm^3 Wasser, 5 cm^3 enthalten 3·57 cm^3, die mit 5 cm^3 der Proteinlösung 8·57 cm^3 ausmachen. Da 1 cm^3 Wasser 0·38 *g* Sulfat löst, müssen 8·57 cm^3 3·26 *g* gelöst enthalten, um 5 Zehntel gesättigt zu sein. Da man 5 cm^3 gesättigter Lösung zugegeben hat, sind bloß 2·7 *g* zugefügt worden, infolgedessen enthält die Lösung nur 41% der zur völligen Sättigung notwendigen Menge. Es ist daher wichtig, sich diese Tatsachen bei den nachfolgenden Beschreibungen der Methoden zu merken; in diesen ist der Grad der Sättigung stets auf wirkliche Sättigung bezogen.

E. Lösen von Niederschlägen.

1. Lösen von Niederschlägen im allgemeinen.

Die meisten Proteinniederschläge lösen sich sehr rasch auf, wenn sie in fein verteiltem Zustande mit dem geeigneten Lösungsmittel zusammengebracht werden, dagegen ergeben sich Schwierigkeiten, wenn sich bei der Darstellung der Proteine Klumpen bilden. Ihre Lösung wird daher sehr erleichtert, wenn man das Gemisch in Wasser suspendiert und durch ein feines Siebtuch gehen läßt. Die ungelösten Klumpen werden hiebei auf dem Tuch zurückgehalten und können leicht durch eine steife Borstenbürste zerkleinert werden. Wenn der Niederschlag in Wasser löslich ist oder wenn er durch Ammonsulfat erhalten worden ist und in der durch Behandlung mit Wasser entstehenden verdünnten Salzlösung gelöst wird, so wird er auf diese Weise rasch in Lösung gebracht werden können.

2. Lösung von Globulinniederschlägen.

Niederschläge von Globulinen, die in Wasser unlöslich sind, müssen immer auf obige Weise behandelt werden, um eine fein zerteilte wässerige Suspension zu erhalten. Das zur Lösung dienende Salz darf erst zugefügt werden, nachdem sämtliches Globulin durch das Tuch gegangen ist, denn wird das Salz vor dem Sieben durch

das Tuch zugefügt, so werden stets Klumpen gebildet, die sich nachher nur sehr langsam wieder lösen.

3. Lösen großer Ammonsulfatniederschläge.

Große Niederschläge, die durch Sättigung mit Ammonsulfat erhalten werden und die von der anhaftenden Sulfatlösung nicht befreit werden können, ohne daß viel Zeit und absorbierendes Filtrierpapier angewandt wird, können am besten gelöst werden, wenn man sie, während sie noch viel anhaftende Flüssigkeit enthalten, von den Faltenfiltern trennt und genügend Wasser zufügt, um eine dünne Paste zu erzeugen und die Masse während ungefähr 24 Stunden dialysiert. Auf diese Weise wird genug Ammonsulfat entfernt, um den Niederschlag in einem viel kleineren Volumen löslich zu machen als nötig wäre, wenn so lange Wasser zugefügt würde, bis die Konzentration der anhaftenden Sulfatlösung derart vermindert ist, daß eine Lösung des Niederschlages möglich wird.

F. Waschen von Niederschlägen.

Da es gewöhnlich schwierig ist, Niederschläge von irgendwie beträchtlichen Mengen Protein auf den Filtern derart zu waschen, daß die anhaftende Mutterlauge rasch entfernt wird, müssen die Niederschläge vom Papier entfernt und in fein verteiltem Zustande in der zum Waschen bestimmten Flüssigkeit suspendiert werden. Dies wird bewerkstelligt, indem man die Suspension durch feines Siebtuch gießt. Zur Beschleunigung des Prozesses benützt man eine flache Borstenbürste.

Globulinniederschläge, die durch fraktionierte Fällung aus Salzlösungen erhalten worden sind, werden zuerst mit einer Salzlösung von der Konzentration des Filtrates gewaschen, denn wenn Wasser angewendet wird, so kann Protein aus der Mutterlauge gefällt werden. Nachdem man das ursprüngliche Filtrat völlig ausgewaschen hat, wird die Salzlösung mit Wasser entfernt.

Einige Globulinniederschläge enthalten Verbindungen des Proteins mit kleinen Quantitäten von Säure, welche löslich in reinem Wasser, aber unlöslich in verdünnten Salzlösungen sind. Wenn man diese Niederschläge mit Wasser auswäscht, wird ein Teil des Niederschlages gelöst, wodurch nicht bloß Verluste verursacht werden sondern auch gewöhnlich Verstopfung der Filter erfolgt, auch wird darauffolgendes Waschen unmöglich gemacht. In solchen Fällen wird mit verdünnter Salzlösung gewaschen. Der Niederschlag wird nachher bis zur Entfernung des Salzes mit verdünntem Alkohol, dann mit stärkerem Alkohol und zuletzt mit absolutem Alkohol und Äther behandelt.

G. Trocknen von Niederschlägen.

Präparate, die vollständig mit absolutem Alkohol ausgewaschen worden sind, werden leicht von der noch anhaftenden Feuchtigkeit so weit befreit, daß sie in ein feines Pulver übergeführt werden können. Wenn jedoch die Behandlung mit absolutem Alkohol nicht genügend gewesen war, werden die Präparate zäh und hart. Hiedurch wird die spätere Entfernung aller anhaftenden Flüssigkeit und die Pulverisierung erschwert.

Vorläufiges Trocknen wird erzielt, wenn man das Präparat entweder in einem Exsikkator oder bei mäßiger Temperatur in einem Strom von trockener Luft in einer dünnen Schicht auf dem Boden einer flachen Schüssel oder auf einer Schicht Filtrierpapier ausbreitet. Beim Trocknen großer Quantitäten von Niederschlägen müssen die größeren Klumpen zerkleinert werden, sobald sie leicht zerdrückt werden können, so daß Feuchtigkeit, die nicht völlig entfernt worden ist, durch die ganze Masse verteilt wird. Dies verhindert, daß ein Teil des Präparates in zähe und hornige Klumpen verwandelt wird.

So getrocknet, bis der Alkohol größtenteils entfernt ist, sind die Präparate in geeignetem Zustand, um zu fernerem Gebrauch aufbewahrt zu werden. Die meisten Präparate halten in diesem Zustand 8 bis 10% Feuchtigkeit und Alkohol zurück. Vollständiges Trocknen erfordert mehrstündiges Erhitzen auf zirka 110°.

Infolge der hygroskopischen Natur von völlig trockenen Proteinen müssen Präparate für Analysenzwecke wenigstens 6 bis 8 aufeinander folgende Stunden im Trockenschrank gehalten werden. Die Vollständigkeit der Trocknung muß durch ein zweites, gleich langes Erhitzen kontrolliert werden. Wenn die zweite Periode des Trocknens von zu kurzer Dauer ist, nehmen die Präparate gewöhnlich an Gewicht zu, indem sie während des Erwärmens im Trockenschrank Feuchtigkeit aufnehmen. Sie halten diese so zähe zurück, daß mehrstündiges Erhitzen nötig ist, um sie wieder völlig auszutreiben.

H. Prüfung der Reinheit der Präparate.

Farbstoffe, die häufig vorhanden sind, brauchen nicht besonders nachgewiesen zu werden, da sie dem Auge leicht sichtbar sind. Die Verunreinigungen, nach denen hauptsächlich in den Präparaten von Samenproteinen gesucht werden muß, sind: Säuren verschiedener Art, mineralische Bestandteile, Öle und andere ätherlösliche Bestandteile und Kohlehydrate. Diese Verunreinigungen können durch folgende Methoden nachgewiesen werden.

1. Gebundene Säuren.

Die zur Bildung von Proteinsalzen nötige Menge Säure ist sehr klein, denn gewöhnlich braucht es wenig mehr als 1 cm^3 und selten mehr als 2 cm^3 1 Zehntel normales Alkali, um 1 *g* des Präparates gegenüber Phenolphthalein zu neutralisieren. Die Menge der gebundenen Säuren kann bestimmt werden, indem man 1 *g* des Präparates in zirka 10 cm^3 neutraler Kochsalzlösung auflöst, etwas Phenolphthalein zufügt und mit einem Zehntel normaler Kali- oder Natronlauge titriert. Die Endreaktion ist gewöhnlich scharf.

Wenn man die Reinheit der Proteinpräparate prüft, so ist die Tatsache, daß Proteinsalze vorliegen, von großer Wichtigkeit, denn der hauptsächlichste Zweck bei der Darstellung ist die Gewinnung von Produkten, die eine einzige Proteinsubstanz enthalten, nicht die Gewinnung einer einzigen bestimmten Verbindung dieses Proteins. Bei unseren gegenwärtigen Kenntnissen kann das letztere gewöhnlich nicht erreicht werden.

Geringfügige Unterschiede im Gehalt an gebundener Säure können große Unterschiede in der Löslichkeit des Proteins verursachen und leicht zum Glauben führen, daß ein Präparat, das in Wirklichkeit nur ein einziges Protein enthält, ein Gemisch von zwei ganz verschiedenen Proteinen darstellt. So können aus Hanfsamen Präparate von Edestin erhalten werden, die in Wasser völlig unlöslich sind, während andere darin teilweise oder sogar größtenteils löslich sind. Diese Verschiedenheit rührt von der Gegenwart eines etwas größeren Gehaltes an gebundener Säure in dem Teil, der in Wasser löslich ist, her, denn wenn dieser gegen Phenolphthalein neutralisiert wird, wird das Produkt völlig unlöslich in Wasser.

Die Tatsache, daß Proteinpräparate, wie sie gewöhnlich erhalten werden, fast immer Mischungen von solchen Proteinsalzen darstellen, verdient besondere Beachtung in Beziehung auf die Gegenwart des Phosphors, denn ein Phosphorgehalt schließt nicht notwendigerweise in sich, daß das fragliche Protein als Nukleoprotein oder Phosphorprotein betrachtet werden muß.

In den Samenextrakten ist gewöhnlich eine nicht unbeträchtliche Menge von Phosphorsäure und zweifellos an organische Säuren gebundener Phosphor vorhanden. Diese phosphorhaltigen Säuren können sich teilweise oder vollständig mit dem Protein zu einem Proteinsalz vereinigen. Dieser gebundene Phosphor verschwindet aus den Präparaten nach einer genügenden Anzahl von Fällungen und ist in solchen, wie den studierten Fällen, kein integrierender Bestandteil des Proteinmoleküls.

So enthalten Edestinpräparate, die durch direkte Dialyse des Hanfsamenextraktes erhalten werden, stets einen kleinen Betrag von Phosphor. In Wasser suspendiert und gegen Phenolphthalein

neutralisiert, bleibt das Edestin ungelöst. Wenn das Edestin abfiltriert und die Lösung zur Trockne verdampft wird, enthält der Rückstand sämtliches zur Neutralisation erforderlich gewesene Alkali als eine Mischung von Alkalisalzen der Säuren, die vorher mit dem Edestin verbunden gewesen waren. Unter diesen ist Alkaliphosphat, was beweist, daß der im rohen Edestin enthaltene Phosphor hauptsächlich aus einer Phosphor enthaltenden Säure besteht. Wenn das rohe Edestin durch Dialyse wiedergefällt wird, so verschwindet der Phosphor größtenteils oder vollständig. Dies trifft auch für die meisten anderen Samenproteine zu, deren Darstellung in den folgenden Seiten beschrieben ist.

Aus Pflanzengeweben, die, wie der Weizenembryo, reich an kernhaltigen Zellen sind, wird mit den Proteinen eine große Quantität von Nukleinsäure extrahiert, und es ist in solchen Fällen schwierig, phosphorfreie Präparate zu erhalten. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß selbst in diesen Fällen der größte Teil dieses Phosphors in der Nukleinsäure enthalten ist, die mit dem Protein einfach als Salz verbunden ist, denn bei fraktionierter Fällung schwankt der Gehalt an Phosphor in den einzelnen Fraktionen sehr weit, und es können Fraktionen erhalten werden, die überhaupt keinen Phosphor enthalten[1]).

Rohe Proteinpräparate aus Leguminosensamen enthalten gewöhnlich eine nicht unbeträchtliche Quantität von Phosphor, was zu dem weitverbreiteten Glauben geführt hat, daß diese Proteine Phosphor in ihren Molekülen enthalten. Wenn jedoch diese Präparate sorgfältig durch aufeinander folgende Fällungen gereinigt werden, werden sie phosphorfrei erhalten, ohne daß sie eine merkliche Veränderung in ihren Eigenschaften oder ihrer Zusammensetzung zeigen. Der Phosphorgehalt muß daher als Verunreinigung betrachtet werden[2]).

2. Anorganische Verunreinigungen.

Aus Samen dargestellte Proteine enthalten gewöhnlich eine geringere Menge anorganischer Verunreinigungen als die aus den tierischen Geweben dargestellten Proteine. Neben der eben erwähnten geringen Menge anorganischer Säuren weisen die meisten Präparate von Samenproteinen eine geringe Menge anorganischer Stoffe auf, die als Asche erscheinen, wenn die Präparate verbrannt werden. Präparate, die zwei- oder dreimal aus verhältnismäßig verdünnten Lösungen wiedergefällt worden sind, enthalten gewöhnlich 0·2 bis 0·4 % Asche und bei denjenigen, die noch sorgfältiger gereinigt

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*: The Nucleic Acid of the Wheat Embryo and its Protein Compounds. Journ. Amer. Chem. Soc. **22**. 379 (1900).

[2]) Vgl. dazu unter „Legumin". 305 ff.

worden sind, sinkt der Aschegehalt sogar auf noch weniger als 0·1%, so daß solche Verunreinigungen in gut gereinigten Präparaten wenig Berücksichtigung erfordern.

3. Ätherlösliche Verunreinigungen.

Die meisten der Proteine, deren Darstellung in den folgenden Seiten beschrieben wird, werden gewöhnlich frei von ätherlöslichen Beimengungen erhalten, wenn ihre Lösungen vor der endgültigen Fällung sorgfältig vollständig klar filtriert werden. Die Präparate müssen jedoch immer mit trockenem Äther gewaschen werden. Die Abwesenheit von ätherlöslichen Verunreinigungen wird durch Verdunstung eines Teiles der letzten Ätherwaschungen festgestellt.

4. Prüfung auf Kohlehydrate.

Gut gereinigte Präparate einer großen Zahl der aus Pflanzen dargestellten Proteine geben keine Reaktion mit α-Naphthol und Schwefelsäure (*Molisch*-Reaktion). Diese Reaktion wird mit allen Kohlehydraten erhalten und kann daher verwendet werden, um die Gegenwart von Kohlehydraten in den Präparaten mancher in den folgenden Seiten beschriebener Proteine nachzuweisen. Dieser Nachweis ist jedoch so empfindlich, daß große Sorgfalt angewendet werden muß, um Präparate zu erhalten, welche diese Reaktion nicht geben, denn selbst eine geringe Quantität von Filtrierpapierfasern, die dem Präparat beigemengt sind, wird eine positive Reaktion bedingen. Die Abwesenheit dieser Reaktion zeigt nicht bloß das völlige Fehlen von beigemengten freien Kohlehydraten an, sondern auch die Abwesenheit von Nukleinsäuren, Glukosiden und anderer kohlehydratgebender Substanzen.

Eine Anzahl der in den folgenden Seiten beschriebenen Präparate gibt *Molisch*sche Reaktion in geringem Grade, was zweifellos von einer Spur kohlehydratgebender Substanz herrührt, die schwieriger zu entfernen ist als das mit den die Reaktion nicht gebenden Präparaten vorkommende Kohlehydrat. Eine Anzahl anderer Proteine geben eine starke Reaktion mit dem *Molisch*-Reagens. Vielleicht liegt hier eine Kohlehydratkomponente des Eiweißes selbst vor.

Bei Anwendung der *Molisch*schen Reaktion muß deren große Empfindlichkeit in Betracht gezogen werden, da eine ganz unbedeutende Menge von Kohlehydrat eine sehr starke Reaktion gibt. So genügen z. B. 0·2 *mg* Filtrierpapier, 0·1 *mg* Arabinose oder Dextrin und 0·5 *mg* Nukleinsäure, um unter den folgenden, für die Prüfung der Proteine geeigneten Bedingungen starke Reaktionen zu erhalten.

Ungefähr 50 *mg* des Proteins werden in 1 cm^3 Wasser suspendiert, 3 bis 5 Tropfen einer 15%igen alkoholischen α-Naphthollösung zugefügt und dann die Proteinlösung allmählich und vollständig

mit 3 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure gemischt. Wenn Kohlehydrate vorhanden sind, so entwickelt sich bald nach der Zufügung der Schwefelsäure eine tiefe Purpurfärbung, deren Intensität bei der Zugabe von mehr Säure zunimmt. Die Färbung wird durch zuviel Säure zuletzt zerstört, so daß Sorge getragen werden muß, daß die Säure allmählich und unter fortwährendem Schütteln zugefügt und die Maximalintensität der Färbung beobachtet wird.

Wenn in den Präparaten, die nach obigen Angaben *Molisch*sche Reaktion nicht geben, die völlige Abwesenheit jeder Kohlehydratspur bewiesen werden soll, muß die Probe mit einer größeren Menge des Präparates wiederholt werden.

Ritthausens Reaktion kann ebenfalls zur Prüfung auf Kohlehydrate verwendet werden, aber das Resultat ist ungewiß, denn in denjenigen Präparaten, die, wie Ovalbumin, Glukosamin enthalten, läßt sich die Kohlehydratgruppe auf diesem Wege nicht nachweisen. Ungefähr 0·5 *g* des Proteins werden in 5 cm^3 Wasser suspendiert, dann wird 5 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure zugefügt und die Lösung 5 bis 10 Minuten gekocht. Sodann wird mit 30 bis 40 cm^3 Wasser verdünnt und einige Stunden stehen gelassen. Wenn die verdünnte Lösung nur wenig gefärbt ist und klar bleibt, so darf die Abwesenheit von Stärke, Gummi usw. angenommen werden. Wenn sich ein flockiger, dunkler Niederschlag absetzt, so ist die Gegenwart dieser Kohlehydrate wahrscheinlich. Es muß jedoch daran erinnert werden, daß alle Proteine, wenn sie lange mit siedender Schwefelsäure hydrolysiert werden, unlösliche Produkte von ähnlichem Aussehen liefern, und es ist nicht ausgeschlossen, daß derartige Produkte auch unter den oben beschriebenen Umständen entstehen. Wenn das Präparat Fett enthält, so wird die verdünnte Lösung trüb, und es muß Sorge getragen werden, diese Trübung von dem durch die Kohlehydrate verursachten flockigen, dunkelgefärbten Niederschlag zu unterscheiden.

Die Tatsache, daß viele Samenproteine aus kohlehydratreichen Geweben absolut frei von diesen Substanzen erhalten werden können, ist ein starker Beweis, daß die Proteinpräparate, was adsorbierte Verunreinigungen betrifft, in höherem Reinheitsgrad dargestellt werden können, als von vielen auf diesem Felde arbeitenden Forschern angenommen wird.

IV. Spezielle Methoden zur Darstellung der einzelnen Proteine.

I. Globuline.

1. Edestin aus Hanfsamen (Cannabis sativa).

Der Name Edestin ist für mehrere anscheinend ähnliche Proteine verschiedener Samenspezies angewandt worden, ist hier

aber zur Bezeichnung des hauptsächlichsten Proteins des Hanfsamens gebraucht, da deutliche Unterschiede zwischen diesem Protein und denen anderer Samen existieren. Neben Edestin, das verhältnismäßig leicht kristallisiert erhalten wird, kann durch Extraktion mit neutralen Salzlösungen nur ein sehr geringes Quantum anderer Proteinsubstanzen gewonnen werden. Diese bestehen aus Proteosen und aus Spuren eines Proteins, das beim Erhitzen des Kochsalzextraktes auf zirka 86° koaguliert und das durch Sättigung mit Natriumchlorid gefällt wird[1]).

a) Darstellung des Edestins.

Die Hanfsamen werden in einer Mühle unter Beifügung von Kerosin gemahlen. Die gemahlene Masse wird dann mit Petroläther extrahiert oder durch Druck vom größten Teil des Öles und Kerosins befreit. Die Hüllen werden durch Sieben entfernt. 100 *g* des feinen Mehles werden dann mit zirka 300 cm^3 10%iger, mit Phenolphthalein versetzter Kochsalzlösung behandelt und kalt gesättigte Barytlösung allmählich zugefügt, bis dsa Extrakt nach tüchtigem Durchrühren eine blaßrote Färbung zeigt. Die hiezu erforderliche Menge Barytlösung wird notiert.

1 *kg* desselben Hanfsamenmehls wird dann mit 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung behandelt. Hiezu fügt man nach tüchtigem Durchrühren eine Mischung von 800 cm^3 10%iger Kochsalzlösung und einer Menge von Barytlösung, welche ungefähr 50% weniger beträgt als die Menge, welche nötig ist, um die saure Reaktion des Samenextraktes gegen Phenolphthalin zu neutralisieren (gewöhnlich ungefähr 200 cm^3). Das Ganze wird dann nochmals tüchtig durchgerührt und auf 3 bis 4 Faltenfilter (*Schleicher & Schüll*, Nr. 580, 38 *cm*) gegossen, nachdem diese vorher mit 10%iger Kochsalzlösung befeuchtet worden sind. Nach 3 Stunden hat man ungefähr 1500 cm^3 eines leicht getrübten Filtrates erhalten, das gegen genau neutrales Lackmuspapier gerade merklich sauer reagiert. Der Rückstand wird zusammen mit dem Filtrierpapier in ein Becherglas geworfen und mit so viel zerrissenem, weichem Filtrierpapier gemengt, daß alle Flüssigkeit absorbiert und eine halbfeste Masse gebildet wird. Diese wird einem hohen Druck — am besten in einer hydraulischen Presse — ausgesetzt und so zirka 1500 cm^3 eines sehr trüben Preßsaftes erhalten.

Während dieser Rückstand ausgepreßt wird, wird das zuerst erhaltene Filtrat auf einem 20 *cm Büchner*-Trichter durch eine dicke Schicht von Papierbrei filtriert. Wenn dieses Filtrat vollständig durch die Papierschicht durchgegangen ist, wird der trübe Preßsaft

[1]) *Osborne*: Crystallized Vegetable Proteins. Amer. Chem. Journ. **14**. 663 (1892).



auf derselben Schicht filtriert und eine etwas opaleszente, im durchfallenden Licht aber klare Lösung erhalten. Die Zeit, die nötig ist, um den Prozeß auf diesen Punkt zu bringen, beträgt ungefähr 6 Stunden.

Die Lösung wird dann, 4 Tage lang in einem Strom fließenden Wassers dialysiert, während welcher Zeit sich das Edestin in kristallinischem Zustande abscheidet. Der Inhalt des Dialysators wird dann in einem großen Gefäß absetzen gelassen. Nach 3 bis 4 Stunden wird die überstehende, fast völlig klare Flüssigkeit abgehebert. Diese enthält zu wenig suspendiertes Edestin, um eine Filtration zu lohnen und wird, da durch weitere Dialyse keiu Edestin mehr erhalten werden kann, weggeworfen.

Das abgesetzte Edestin wird dann in einem *Büchner*schen Trichter auf einem Stück gehärteten Filtrierpapier gesammelt, mit der Pumpe trocken gesogen und mit Wasser gewaschen. Dieses rohe Edestin wiegt, nachdem es mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet worden ist, ungefähr 125 *g* und ist, mit Ausnahme einer unbedeutenden Menge, in 10%iger Natriumchloridlösung völlig löslich.

Das Edestin kann von dem in eben beschriebener Weise dargestellten Extrakt auch so getrennt werden, daß der klar filtrierte Auszug mit so viel destilliertem, auf 70° erhitztem Wasser verdünnt wird, daß dessen Natriumchloridkonzentration auf 3% reduziert ist. Nachdem die Lösung im Zimmer allmählich erkaltet ist, wird sie an einem kalten Ort 12 bis 20 Stunden lang aufbewahrt und auf ungefähr 5° gekühlt. Die Ausbeute nach dieser Fällungsmethode beträgt ungefähr 100 *g* rohes Edestin aus 1 *kg* ölfreiem Mehl.

Wenn das rohe Edestin gereinigt werden soll, wird es noch feucht in 10%iger Natriumchloridlösung gelöst. Für 125 *g* Edestin soll das Endvolumen nicht geringer als 1500 cm^3 sein. Diese Lösung wird, nachdem sie durch eine dichte Schicht von Papierbrei filtriert worden ist, nochmals 4 oder 5 Tage dialysiert und der Niederschlag, wie oben beschrieben, gewaschen und getrocknet.

Das Edestin kann auch in folgender Weise aus warmer, verdünnter Salzlösung umkristallisiert werden. Es wird so viel 10%ige Natriumchloridlösung zugefügt, bis eine zirka 8%ige Edestinlösung erhalten wird. Stärker konzentrierte Lösungen geben in der Regel bei der nachfolgenden Behandlung keine wohlcharakterisierten Kristalle. Die Lösung wird filtriert, auf 50° erwärmt und dann allmählich mit 2 Volumen Wasser von derselben Temperatur verdünnt. Beim Kühlen der vollständig klaren Lösung auf ungefähr 5° scheidet sich das Edestin in schön kristallisiertem Zustande ab.

Beim Wiederholen dieses Prozesses wird ein sehr reines Produkt erhalten. Dieses wäscht man nach F. mit ungefähr 0·5%iger Natriumchloridlösung, sodann mit 50%igem Alkohol bis zum Ver-

schwinden der Chlorreaktion, nachher mit stärkerem Alkohol und zuletzt einige Male mit absolutem Alkohol und mit Äther. Das Produkt wird im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Das Edestin wird in oben erwähnter Weise mit 0·5%iger Natriumchloridlösung gewaschen, weil ein Teil des Präparates in Wasser löslich, in verdünnter Salzlösung aber unlöslich ist. Dieser Teil enthält mehr Säure als der unlösliche Teil[1]) und entspricht augenscheinlich einer höheren Säureverbindung als der letztere. Um die kristallinische Struktur des ganzen Präparates zu erhalten, wird eine verdünnte Salzlösung zum Auswaschen benützt, die nachher durch verdünnten Alkohol entfernt wird. Wenn ein von gebundener Säure freies Edestin gewünscht wird, muß die letzte Kristallisation aus einer Kochsalzlösung gemacht werden, zu der vorher so viel Kalium- oder Natriumhydroxyd zugefügt worden war, daß die Edestinlösung gegen Phenolphthalein neutral reagiert. Dies wird am besten erzielt, wenn man durch Titration mit einem Zehntel normalem Alkali die erforderliche Alkalimenge für einen aliquoten Teil des Edestins bestimmt und dann die bestimmte Menge 1 Zehntel normaler Lauge zu dem zur Verdünnung der Edestinlösung nötigen Wasser fügt. Sowohl die zur Lösung des Edestins nötige Salzlösung als auch das zur Verdünnung erforderliche Wasser werden durch Sieden von Kohlensäure befreit. Die Edestinlösung wird nach dem Verdünnen in einem geschlossenen Gefäß abkühlen gelassen. Das neutrale Edestin wird so rasch wie möglich auf einem *Buchner*schen Trichter abgesaugt und möglichst wenig der Luft ausgesetzt[2]).

Edestin kann auch dargestellt werden durch Extraktion der Hanfsamen mit heißer 3%iger Kochsalzlösung bei 50 bis 60°. In diesem Falle wird die Filtration so schnell wie möglich auf einem Faltenfilter aus weichem Papier ausgeführt unter Anwendung eines Heißwassermantels oder über einem Dampftisch, so daß die Lösung während der Filtration warm bleibt. Da der Rückstand nach der Filtration nicht genügend ausgepreßt werden kann, ohne kalt zu werden, so ist es besser, ihn zusammen mit den Filtern in 3%iger auf 60° erwärmter Natriumchloridlösung zu erhitzen und ihn auf frisches Filtrierpapier zu bringen. Beim allmählichen Abkühlen des filtrierten Extraktes scheidet sich das Edestin in Kristallen ab, die nach erfolgter Filtration mit verdünnter Salzlösung, dann mit

[1]) *Osborne*: Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 240 (1901); ebenso *Osborne*: The Basic Character of the Protein Molecule and the Reaction with definitite Quantities of Acids and Alkalis. Journ. Amer. Chem. Soc. **24**. 39 (1902).

[2]) *Osborne*: Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 265 (1901); ebenso *Osborne*: The Basic Character of the Proteinmolecule and the Reactions of Edestin with definite Quantities of Acids and Alkalis. Journ. Amer. Chem. Soc. **24**. 50 (1902.)



50%igem Alkohol gewaschen werden. Das so erhaltene rohe Edestin kann in der soeben beschriebenen Weise durch Umkristallisieren gereinigt werden.

b) Eigenschaften des Edestins.

Elementare Zusammensetzung. Analysen von kristallisiertem Edestin von *Ritthausen*[1]), *Osborne*[2]), *Chittenden* und *Mendel*[3]) und von *Abderhalden*[4]) haben folgende, gut miteinander übereinstimmende Zahlen ergeben: C 51·3, H 6·9, N 18·7, S 0·9, O 22·2%.

Löslichkeit. Das von Säuren oder Basen völlig freie Edestin ist gänzlich unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen: wenn es mit einer Menge Salzsäure verbunden ist, die nicht größer ist als 0·7 cm^3 1 Zehntel Normallösung pro Gramm, so ist es ebenfalls unlöslich in Wasser; mit mehr Säure verbunden wird es proportional dem vorhandenen Säuregehalt löslich.

Die Salze von Edestin mit Säuren sind unlöslich in sehr verdünnten Salzlösungen, hingegen leicht löslich in stärkeren Salzlösungen. Die zur Lösung erforderliche Salzmenge ist proportional der Menge der gebundenen Säure. Bei Gegenwart einer nur kleinen Menge von Säure wird ein Teil des Edestins in Edestan verwandelt, das in Salzlösungen vollständig unlöslich ist[5]). Die Menge dieses Produktes hängt von dem Betrage der vorhandenen Säure und von der Dauer ihrer Einwirkung ab. Reines und neutrales Edestin ist in den Lösungen der meisten Mineralsalze löslich, jedoch unlöslich in den Lösungen von Kalium-, Natrium- oder Ammoniumazetat[6]). In Lösungen von starken Basen mit schwachen Säuren, die mit alkalischer Reaktion dissoziiert hydrolytisch sind, ist Edestin löslicher als in Lösungen von Salzen starker Basen mit starken Säuren von entsprechender molekularer Konzentration, während es in Lösungen von Salzen schwacher Basen mit starken Säuren, die mit saurer Reaktion hydrolytisch dissoziiert sind, weniger löslich ist.

---

[1]) *Ritthausen*: Zusammensetzung der Eiweißkörper der Hanfsamen und des kristallisierten Eiweiß auf Hanf und Rizinussamen. Journ. f. prakt. Chemie. (2). **25**. 130 (1882).

[2]) *Osborne*: Crystallized vegetable Proteids. Amer. Chem. Journ. **14**. 662 (1892).

[3]) *Chittenden* and *Mendel*: On the Proteolysis of Crystallized Globulin. Journ. of Physiol. **17**. 48 (1894).

[4]) *E. Abderhalden*: Hydrolyse des Edestins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **37**. 499 (1903).

[5]) *Osborne*: Ein hydrolytisches Derivat des Globulins Edestin und sein Verhältnis zu *Weyl*s Albuminat und zur Histongruppe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 225 (1901); derselbe: A Hydrolytic Derivate of the Globulin Edestin and its relation to *Weyl*s Albuminate and the Histon Group. Jour. Amer. chem. Soc. **24**. 28 (1902).

[6]) Cf. *Osborne* and *Harris*: The Solubility of Globulin in Salt Solutions. Amer. Journ. of Physiol. **14**. 151 (1905).

Edestin ist löslich in gesättigter Natriumchloridlösung, aber unlöslich in gesättigter Magnesiumsulfatlösung.

Hitzekoagulation. In 10%iger Natriumchloridlösung bildet das Edestin beim Erhitzen auf 87° eine leichte Trübung, bei 94° scheiden sich Flocken ab. Wenn die Lösung nach einigem Erhitzen auf 98° filtriert wird, wird durch weiteres Erwärmen der filtrierten Lösung kein Koagulum mehr erzielt. Das nach dem Erhitzen nicht koagulierende Edestin ist wahrscheinlich unverändert, denn es kann durch Dialyse der Lösung in unveränderten Kristallen erhalten werden. Wenn nach dem Sieden eine sehr geringe Säuremenge zu der Lösung gefügt wird, bildet sich bei wiederholtem Sieden ein zweites Koagulum und durch Wiederholung dieses Prozesses kann praktisch sämtliches Edestin in das Koagulum übergeführt werden[1]). Die zur völligen Koagulation nötige Menge Säure kann nicht auf einmal von Anfang an zugefügt werden, denn diese Menge Säure würde schon vor dem Erhitzen das Edestin aus der Salzlösung ausfällen.

Spezifische Rotation[2]). Gelöst in 10%iger Natriumchloridlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -41{\cdot}3^{02}$).

Fällung mit Ammonsulfat[3]). Nach *Hofmeisters* Methode beginnt die Fällung in 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung mit 3 *cm*³ und ist vollständig mit 4·2 *cm*³, was 23 und 35% wirklicher Sättigung entspricht[3]). In 10%iger Natriumchloridlösung sind die Fällungsgrenzen zwischen 1·8 und 3 *cm*³ Sättigung.

Farbreaktionen. Edestin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine mit Ausnahme von *Molisch*scher Reaktion[4]).

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [5]), [6]), [7]).

---

[1]) cf. *Chittenden* and *Mendel*: On the Proteolysis of Crystallized Globulin. Journ. of Physiol. **17**. 48 (1894).

[2]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

[4]) *Erb*: Über das Salzsäurebindungsvermögen einiger reiner Eiweißkörper. Zeitschr. f. Biol. **41**. 309 (1901). Ferner *Osborne* and *Harris*: The Carbohydrate Group in the Protein Molecule. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 474 (1903).

[5]) *E. Abderhalden*: Hydrolyse des Edestins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **37**. 499 (1903) und **40**. 249 (1903).

[6]) *Osborne* and *Gilbert*: The Proportion of Glutaminic acid yielded by various Vegetable Proteins when decomposed by Boiling with Hydrochloric acid. Amer. Journ. of Physiol. **15**. 333 (1906).

[7]) *Kossel* und *Patten*: Zur Analyse der Hexonbasen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **38**. 39 (1903).

Stickstoffverteilung[1]). N als NH_3 1·88%, basischer N 5·91%, nicht basischer N 10·78%, N im Mg O-Niederschlag 0·12%.

2. Exzelsin aus der brasilianischen oder Paranuß (Bertholletia excelsa).

Exzelsin ist der hauptsächliche Eiweißbestandteil dieser Nuß. Es war das erste künstlich kristallisierte Pflanzenprotein. Diese Kristalle, die durch *Maschke*[2]) erhalten wurden, bilden hexagonale Platten und bestehen aus einem in Wasser unlöslichen Proteinsalz. Im freien Zustand ist Exzelsin löslich in Wasser. Exzelsin kann daher aus den Nüssen mit reinem Wasser extrahiert werden und scheidet sich daraus, infolge der allmählichen Entwicklung von Säure im Extrakt, in Kristallform ab. *Maschke* erkannte die Tatsache, daß diese Kristalle eine Säureverbindung des Proteins sind[3]).

a) Darstellung des Exzelsins.

Die Nüsse werden von ihren Schalen durch Zertrümmern mit einem Hammer befreit und alle ungesunden Kerne ausgelesen. Es ist unnötig, die dunkelgefärbte äußere Samenhaut zu entfernen, denn die Ausbeute an Exzelsin wird durch ihre Gegenwart nicht beeinflußt. Die Kerne werden zerkleinert und vom größeren Teil des Öles befreit. Die ölfreien Mehle machen ungefähr 17% der schalenfreien Nüsse aus.

1 *kg* Mehl wird mit ungefähr 8 *l* einer 3%igen, auf 45 bis 50° erwärmten Ammonsulfatlösung behandelt. Nach etwa einstündiger Digestion wird die Mischung durch feines Tuch gesiebt, der Rückstand mit Filtrierpapier gemischt und so trocken als möglich gepreßt. Der Auszug wird dann völlig klar filtriert und dialysiert.

Das Exzelsin, das sich in gut ausgebildeten, von amorphen Bestandteilen völlig freien, hexagonalen Platten abscheidet, wird dann vom Dialysator entfernt und durch Dekantieren gewaschen; zuerst mit 10%igem Alkohol, der 0·25% Natriumchlorid enthält, dann mit 20%igem Alkohol, 0·12% Natriumchlorid enthaltend; hierauf sukzessive mit 40-, 75- und 90%igem Alkohol und zuletzt mit absolutem Alkohol. Nachdem der Alkohol in einem *Büchner*-Trichter auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapieres abgesaugt worden ist, wäscht man das Exzelsin mit trockenem Äther und

[1]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[2]) *Maschke*: Kristallisierte Kaseinverbindung. Journ. f. prakt. Chemie. **74**. 436 (1858).

[3]) *Maschke*: Über den Bau und die Bestandteile der Kleberbläschen (Kleberkörnchen) in Bertholletia, deren Entwicklung in Rizinus, nebst einigen Bemerkungen über Amylonbläschen. Journ. f. prakt. Chemie. **79**. 148 (1860).

trocknet über Schwefelsäure. Die Ausbeute beträgt ungefähr 20% des ölfreien Mehles. Da das Exzelsin das einzige Protein des Mehles ist, das durch Dialyse gefällt wird, und da das Volumen der Lösung, aus der es abgeschieden wird, ein verhältnismäßig großes ist, so ist das so erhaltene Produkt sehr rein. Wenn weitere Reinigung erwünscht wird, so kann das Exzelsin in einer ungefähr 6%igen Ammonsulfatlösung wieder gelöst und durch Zugabe von mehr Ammonsulfat zur erhaltenen Lösung bis zur 6 Zehntel-Sättigung wiedergefällt werden. Der so erhaltene Niederschlag wird auf gehärteten Faltenfiltern abfiltriert, in verdünnter Ammonsulfatlösung gelöst und, wie oben beschrieben, durch Dialyse wiedergefällt.

Das so erhaltene Exzelsin bildet ein dichtes, schneeweißes Pulver, das durch Glitzern im reflektierten Sonnenlicht dem bloßen Auge seinen kristallinischen Charakter offenbart.

b) Eigenschaften des Exzelsins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·2, H 6·9, N 18·2, S 1·1, O 21·6%.

Löslichkeit. Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Exzelsin ist unlöslich in Wasser, aber löslich in neutralen Salzlösungen. Wird das Exzelsin in destilliertem Wasser suspendiert und mit Natrium- oder Kaliumhydroxyd gegen Phenolphthalein neutralisiert, so ist es völlig löslich. Die so erhaltene Lösung ist, obgleich sie gegen Phenolphthalein neutral ist, gegen Lackmus alkalisch. Exzelsin verhält sich demnach gegen Alkali analog wie Edestin, mit der Ausnahme, daß Exzelsin in Wasser löslich wird, wenn es gegen Phenolphthalein vollständig neutralisiert wird, während Edestin unlöslich ist[2]). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die saure Reaktion des kristallisierten Exzelsins, wie schon beim Edestin bewiesen worden ist, von der gebundenen Säure herrührt und daß das freie Exzelsin in Wasser löslich ist, während seine Salze mit Säuren darin unlöslich sind. Die Exzelsinsalze haben die Löslichkeit eines Globulins. Exzelsin ist löslich in gesättigten Natriumchloridlösungen.

Hitzekoagulation[3]). In 10%iger Natriumchloridlösung wird beim allmählichen Erwärmen auf 70° eine Trübung hervorgerufen. Bei weiterem Steigern der Temperatur auf 86° scheiden

[1]) *Osborne*: Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chem. Journ. **14.** 662 (1892). Ferner *Osborne* and *Harris*: Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins, 2d Paper. Amer. Journ. of Physiol. **13.** 436 (1905).

[2]) *Osborne*: Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33.** 240 (1901).

[3]) *Osborne*: Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chem. Journ. **14. 662** (1892).



sich Flocken ab, deren Menge allmählich zunimmt, wenn die Temperatur auf 100° gesteigert wird.

Spezifische Drehung[1]). In 10%iger Natriumchloridlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -42\cdot9^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[2]). Wird Exzelsin nach der beschriebenen Methode dargestellt, so wird es nach *Hofmeisters* Methode in 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, mit 4 bis 5·5 *cm*³ oder bei 32 bis 46% wirklicher Sättigung gefällt.

Farbenreaktionen. Exzelsin gibt alle Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [3]).

Stickstoffverteilung[4]). N als NH_3 1·48, basischer N 5·76, nicht basischer N 10·97, N im MgO-Niederschlag 0·17%.

3. Globulin aus Kürbissamen (Cucurbita maxima).

Die Samen des Kürbis enthalten eine verhältnismäßig große Menge Protein, von dem der größere Teil leicht in oktaedrischen Kristallen erhalten wird[5]). Die Extrakte dieses Samens ergeben auch eine sehr kleine Menge eines anderen Globulins, das bei einer niedrigeren Temperatur als das kristallinische Globulin koaguliert und von welchem das letztere durch Umkristallisieren oder Umfällen aus verdünnten Salzlösungen getrennt werden kann.

a) Darstellung des Kürbissamenglobulins.

Wenn man die Samen zur Extraktion vorbereitet, ist es zur Erzielung guter Ausbeuten und farbloser Produkte nicht nötig, die voluminösen Schalen und äußeren Samenhäute vollständig zu entfernen. Will man jedoch eine Trennung herbeiführen, so geschieht dies am besten mit der Hand. Die Samen werden längs der Naht mit einem scharfen Messer aufgeschnitten und der Kern herausgenommen. Die äußere Haut des Kernes wird dann sorgfältig mit dem Messer abgeschabt. Dieser Prozeß schließt so viel Arbeit und Verluste in sich, daß es unpraktisch ist, größere Quantitäten dieses Globulins auf diese Weise darzustellen.

[1]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[2]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

[3]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Excelsin. Amer. Journ. of Physiol. **19**. 53 (1907).

[4]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[5]) cf. *G. Grübler*: Über ein kristallinisches Eiweiß der Kürbissamen. Journ. f. prakt. Chemie. (2). **23**. 97 (1881).

Größere Mengen von Kürbissamenmehl werden erhalten, indem man die Samen grob mahlt, am besten in der Kaffeemühle Durch Sieben des so erhaltenen Produktes auf einem groben Sieb kann ein großer Teil der Schalen entfernt werden, ohne daß man viel von den Kernen verliert. Das gesiebte Mehl wird dann mit Kerosin gemischt und noch einmal auf der Kaffeemühle gemahlen Nachdem man das Öl mit Petroläther extrahiert hat, kann der größte Teil der noch vorhandenen Schalen durch Sieben entfernt werden.

1 *kg* dieses Mehles wird mit 4 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt. Nach tüchtigem Umrühren wird der Auszug filtriert. Das klar filtrierte Extrakt wird mit dem 4fachen Volumen destilliertem Wasser, das vorher auf 65° erhitzt war, verdünnt. Nach allmählichem Abkühlen im Zimmer auf 20° wird die Lösung im Eisschrank auf zirka 5° gekühlt. Das Globulin scheidet sich in oktaedrischen Kristallen ab und läßt eine fast klare Lösung zurück. Diese wird abgehebert und der Niederschlag auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapieres in einem *Buchner*schen Trichter gesammelt. Nachdem man die Mutterlauge abgesaugt hat, wird der Niederschlag vom Papier weggenommen, durch ein Koliertuch in einer 0·5%igen Natriumchloridlösung suspendiert und noch einmal abgesaugt. Dann wird er sukzessive mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol und mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute beträgt ungefähr 10% des Mehles und das Produkt, obgleich nur einmal gefällt, ist verhältnismäßig rein infolge des sehr großen Volumens, aus dem es sich allmählich abscheidet und infolge der dichten und festen Konsistenz des kristallinischen Niederschlages.

Die Abwesenheit des löslichen Samenglobulins wird dargetan durch die Tatsache, daß so zubereitete Lösungen des Globulins in 10%iger Natronlauge vollständig klar bleiben, wenn sie bis 87° erhitzt werden, während Lösungen, die nur einmal durch Dialyse des Extraktes hergestellt waren, bei 73° trübe werden und bei 84° einen flockigen Niederschlag geben.

Das so erhaltene Globulin kann durch Umkristallisieren weiter gereinigt werden, aber dieser Prozeß bedingt gewöhnlich einen großen Materialverlust, da mehr oder weniger Protein bei dieser Fällung in neutralen Salzlösungen unlöslich wird. Wenn das Globulin umkristallisiert werden soll, wird es vom Filter weggenommen und durch ein Siebtuch in Wasser suspendiert. Das Volumen der Suspension wird auf 600 cm^3 gebracht. Es werden dann 600 cm^3 20%iger Natriumchloridlösung zugefügt. Nachdem das unlösliche Produkt sich abgesetzt hat, wird die Lösung sorgfältig durch ein Filter von Papierbrei filtriert. Wenn die Menge des unlöslichen Produktes beträchtlich ist, wird dieses auf ein weiches Faltenfilter

gebracht. Nachdem der größte Teil der Lösung abgelaufen ist, werden Niederschlag und Filter auf einer Schicht von Papierbrei abgesogen. Wenn die Quantität des unlöslichen Proteins nur klein ist, kann alles auf einmal auf dem Filterbrei filtriert werden.

Die klare Lösung wird dann mit 4 Volumen auf 65° erhitzten Wassers verdünnt und das Globulin, wie vorher, umkristallisiert.

b) Eigenschaften des Kürbissamenglobulins.

Elementare Zusammensetzung[1]. C 51·65, H 7·02, N 18·36, S 0·86, O 22·11%.

Diese Zahlen, welche das Mittel sehr nahe übereinstimmender Analysen von *Barbieri*, *Ritthausen*, *Chittenden* und *Hartwell*, *Grübler* und *Osborne* sind, stellen die Zusammensetzung dieses Proteins innerhalb sehr enger Grenzen fest.

Löslichkeit[2]. Völlig unlöslich in Wasser. Leicht löslich in verhältnismäßig starken Kochsalzlösungen, aber sehr wenig löslich in 2%igen und verdünnteren Natriumchloridlösungen. Löslich in gesättigter Natriumchloridlösung. Unlöslich in gesättigter Magnesiumsulfatlösung.

Hitzekoagulation[2]. In 10%iger Natriumchloridlösung erfolgt Trübung beim Erwärmen auf 87°, bei 95° bildet sich ein flockiger Niederschlag. Die von diesem Koagulum abfiltrierte Lösung bleibt beim Sieden klar, gibt aber mit Essigsäure einen reichlichen Niederschlag.

Spezifische Drehung[3]. In 10%iger Natriumchloridlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -38{\cdot}73^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[4]. In ein Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung bei der Bestimmung nach *Hofmeisters* Methode nach Zusatz von 3·3 *cm*³ und ist vollständig mit 4·4 *cm*³ oder bei 26 und 36% wirklicher Sättigung.

Farbreaktionen. Das Kürbissamenglobulin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine, ausgenommen *Molisch*sche Reaktion.

[1] *Osborne*: Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chem. Journ. **14.** 662 (1892).

[2] *Osborne*: Crystallized Vegetable Proteids. Amer. Chem. Journ. **14.** 662 (1892).

[3] *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25.** 842 (1903).

[4] *Osborne* und *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteids. Journ. of the Amer. Chem. Soc. **25.** 837 (1903).

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1]) und [2]).

Stickstoffverteilung[3]). N als NH_3 1·28, basischer N 5·97, nicht basischer N 11·04, N im MgO-Niederschlag 0·22%.

4. Das Globulin des Baumwollsamens (Gossypium herbaceum).

Die Samen der Baumwollpflanze enthalten eine große Menge Protein, das durch Natriumchloridlösungen extrahiert und durch Dialyse gefällt werden kann. Infolge der großen Quantität von Farbstoffen, die in diesen Samen enthalten sind, ist das so erhaltene Globulin leicht gelb gefärbt. Bis jetzt ist keine Methode gefunden worden, nach welcher farblose Präparate erhalten werden. Neben diesem Globulin wird durch neutrale Salzlösungen oder durch Wasser sehr wenig Protein aus den Samen extrahiert. Fraktionierte Fällung des Globulins hat keinen Hinweis gegeben, daß es eine Mischung von 2 oder mehr Proteinen ist[4]).

a) Darstellung des Baumwollsamenglobulins.

Die Samen werden von ihren Hüllen befreit, indem man sie in einer hölzernen Schale mit einem scharfen Fleischhackmesser zerhackt. Beim Sieben auf einem groben Sieb kann der größte Teil der öligen Samen von den meisten Hüllen befreit werden. Die Kerne werden dann mit Kerosin gemischt und in der Kaffeemühle gemahlen. Nachdem man den größten Teil des Öles durch Extraktion mit Petroläther oder durch Auspressen auf einer hydraulischen Presse entfernt hat, wird das grobe Mehl in der Kaffeemühle zu einem feinen Pulver gemahlen.

Das käufliche Baumwollsamenmehl, das nach dem Auspressen des Öles erhalten wird und häufig als Viehfutter dient, kann auch zur Darstellung des Baumwollsamenglobulins verwendet werden und gibt, soweit bis jetzt bekannt ist, dasselbe Resultat. Um große Quantitäten dieses Globulins herzustellen, ist dieses Mehl eine geeignete Quelle. Für ein sorgfältiges Studium der Proteine müssen jedoch die ganzen Samen verwendet werden, damit die Behandlung, der sie unterworfen werden, von Anfang des Prozesses an bekannt

---

[1]) *Abderhalden* und *Berghausen*: Die Monoaminosäuren von aus Kürbissamen dargestelltem, kristallinischem Eiweiß. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **49**. 15 (1906).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of the Cristallized Globulin of Squash-seed. Amer. Journ. of Physiol. **19**. 475 (1907).

[3]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. of the Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[4]) *Osborne* and *Voorhees*: The Proteids of Cotten-seed. Journ. Amer. Chem. Soc. **16**. 778 (1894).

ist. Die Methode der Globulinbereitung ist dieselbe für beide Mehlsorten.

1 *kg* Mehl wird mit 3 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt, wobei ungefähr 2300 cm^3 eines nahezu klaren Extraktes erhalten werden. Dieses wird dann filtriert und 4 Tage lang dialysiert.

Der größere Teil des Globulins wird so als ein etwas zusammenhängender Niederschlag erhalten, von dem die milchige Lösung sorgfältig abgehebert oder abgegossen wird. Letztere wird dann einige Stunden stehen gelassen. Falls sich ein genügender Niederschlag bildet, wird die Lösung abgehebert und der Niederschlag zu der Hauptmenge des Globulins gefügt.

Die Menge des Proteins, die nach mehrstündigem Stehen noch in der Lösung suspendiert bleibt, ist nicht bedeutend und kann verworfen werden, denn selbst nach mehreren Tagen bleibt die Lösung noch trübe und setzt sehr wenig Globulin ab. Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat beweist, daß nur wenig Protein darin enthalten ist.

Das abgesetzte Globulin wird dann in einem gemessenen Volumen Wasser suspendiert, das Volumen der Suspension auf 500 cm^3 gebracht und darin 76 *g* Ammonsulfatkristalle aufgelöst. Die so in 2 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung bewerkstelligte Lösung des Globulins wird vervollständigt, indem sie durch ein feines Siebtuch gegossen wird, um alle Klumpen zu zerteilen. Dann wird sie stehen gelassen, bis die unlösliche Substanz sich abgesetzt hat. Die Lösung wird dann auf einem Filter von Papierbrei filtriert, wobei ein Verstopfen des Filters sorgfältig verhindert werden muß. Falls sich viel unlösliche Substanz absetzt, wird diese am besten auf einem Faltenfilter gesammelt. Wenn nur wenig vorhanden ist, kann direkt auf dem Filter von Papierbrei abgesaugt werden. Nachdem man das Filter mit 2 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen hat, wird das klare Filtrat gemessen und für je 100 cm^3 28·1 *g* Ammonsulfatkristalle zugegeben. Die Lösung wird so 6 Zehntel gesättigt und das Globulin ausgefällt. Die Lösung bleibt mit der Fällung über Nacht stehen. In dieser Zeit zieht sich der Niederschlag zu einer dichten, zusammenhaftenden Masse zusammen, von der die Lösung gewöhnlich fast völlig dekantiert werden kann, ohne daß Protein verloren geht.

Dieser Niederschlag wird dann in ungefähr 500 cm^3 10%iger Kochsalzlösung gelöst und durch Papierbrei klar filtriert Nachdem man die Filter mit der Salzlösung ausgewaschen hat, werden Filtrat und Waschwasser 4 Tage lang dialysiert. Der Inhalt des Dialysators wird ungefähr eine Stunde stehen gelassen; hienach dekantiert man die nahezu klare Lösung so vollständig als möglich. Dann wird der Niederschlag in einem *Buchner*schen Trichter auf eine gehärtete Filtrierpapierschicht gebracht. Nachdem beinahe

trocken gesaugt ist, wird der Niederschlag mit Wasser gewaschen. Der Niederschlag wird dann vom Filter weggenommen, in Alkohol suspendiert, zur feinen Verteilung durch das Siebtuch gegossen und wieder auf das Filter gebracht. Man wiederholt diese Behandlung mit absolutem Alkohol, wäscht den Niederschlag auf dem Filter mit Äther, entfernt ihn vom Filter, zerreibt ihn zu einem feinen Pulver und trocknet über Schwefelsäure.

Das so bereitete Präparat bildet ein leichtes gelbliches Pulver mit folgenden Eigenschaften.

b) Eigenschaften des Baumwollsamenglobulins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·16, H 6·67, N 18·49, S 0·62, O 22·06%.

Löslichkeit[1]). Löslich in mäßig verdünnten und gesättigten Lösungen von Natriumchlorid. Unlöslich in reinem Wasser.

Hitzekoagulation[1]). Teilweise Koagulation beim Erhitzen der 10%igen Kochsalzlösung auf 93 bis 100°.

Spezifische Drehung. Wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat[2]). In 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung bei Anwendung der *Hofmeister*schen Methode nach Zusatz von 4·6 cm^3 und ist vollständig mit 6·4 cm^3, was 38 und 56% wirklicher Sättigung entspricht.

Farbreaktionen. Das Baumwollsamenglobulin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [3]) und [4]).

Stickstoffverteilung[5]). N als NH_3 1·92%, basischer N 5·71 %, nicht basischer N 11·01%.

5. Amandin aus Mandeln (Prunus amygdalus).

Der größere Teil des Proteins dieses Samens besteht aus Amandin, das entweder mit Wasser oder Kochsalzlösung extrahiert werden kann. Extrakte mit Salzlösungen enthalten neben Amandin nur sehr wenig Proteose[6]).

Die Samen des Pfirsichs (Prunus persica) enthalten ein Protein, das mit dem Amandin der Mandel wahrscheinlich identisch ist.

---

[1]) *Osborne* and *Voorhees*: The Proteids of Cotton-seed. Journ. Amer. Chem. Soc. **16**. 778 (1894).

[2]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

[3]) *Abderhalden* und *Rostoski*: Die Monoaminosäuren des „Edestins" aus Baumwollsamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **44**. 265 (1905).

[4]) *Osborne, Leavenworth* and *Brautlecht*: The Different Forms of Nitrogen in Proteins. Amer. Journ. of Physiol. **23**. 180 (1908).

[5]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[6]) cf. *Osborne* and *Campbell*: Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chem. Soc. **18**. 609 (1896).

Amandin ist in Wasser löslich, wenn es von gebundener Säure durch Neutralisation mit Alkali befreit wird. Wenn es mit einer kleinen Menge Säure zu einem Proteinsalz verbunden ist, ist es unlöslich in Wasser und löslich in Salzlösungen und besitzt in diesem Zustande die Eigenschaften eines Globulins.

Wässerige Extrakte der Mandel geben bei Sättigung mit Ammonsulfat Niederschläge. Diese liefern, wenn sie in Kochsalzlösung gelöst sind, nach Dialyse Amandin in Form von sehr kleinen Sphäroiden, die sich bald zu einem halbflüssigen, durchsichtigen Niederschlag vereinigen. Diese Abscheidung wird durch die Säure bewirkt, die sich im Extrakt entwickelt und sich mit dem Amandin zu einem Salz mit Globulineigenschaften vereinigt. Kristallinische Präparate sind aus der Mandel nicht erhalten worden.

a) Darstellung des Amandins.

Die Schalen der Mandeln werden mit der Hand entfernt und ihre äußere Haut losgelöst, indem man die Kerne wenige Sekunden in heißes Wasser eintaucht und zwischen den Fingern preßt. Wenn sie von den Häuten befreit sind, wird der größte Teil des Öles entfernt, indem man sie durch eine Fruchtpresse preßt. Das von der Hauptmenge des Öles befreite Mehl wird dann zu einem feinen Pulver zermahlen.

1 *kg* des Mehles wird mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt und auf große Faltenfilter von weichem Papier (*Schleicher-Schüll*, Nr. 580) gebracht. Wenn die Lösung zum großen Teil durchgegangen ist, wird der Rückstand auf dem Filter, mit einer genügenden Menge Filtrierpapier gemischt und die halbfeste Masse einem hohen Druck ausgesetzt.

Der Preßrückstand wird mit 3 *l* 10%iger Kochsalzlösung aufgerührt und noch einmal gepreßt. Nachdem man den ganzen Auszug durch eine Schicht von Papierbrei filtriert hat, wird er mit Ammonsulfat gesättigt und die Proteinfällung auf einem großen, gehärteten Faltenfilter abfiltriert. Der Niederschlag wird dann in Wasser gelöst, dem man Kochsalz zufügt, falls das am Niederschlag haftende Ammonsulfat zur Lösung nicht genügt. Die Lösung wird dann ohne weitere Filtration 4 oder 5 Tage dialysiert.

Das so gefällte Amandin wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in 2 *l* Wasser suspendiert. Dann werden 760 *g* Ammonsulfat abgewogen und 1 Teil desselben unter Aufrühren des Proteins zur Suspension hinzugegeben, bis sich alles gelöst hat. Dann wird der Rest des Sulfats zugefügt und das Amandin aus der so resultierenden halbgesättigten Lösung gefällt. Diese Fällung wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, in 10%iger

Natriumchloridlösung wieder gelöst, die Lösung völlig klar filtriert und chloridfrei dialysiert.

Das ausgefällte Amandin wird dann absetzen gelassen, die Lösung abgehebert und der Niederschlag auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, mit Wasser und dann mit Alkohol gewaschen, vom Filter entfernt, unter absolutem Alkohol zu einem wasserfreien Pulver zerrieben und auf einem *Buchner*schen Trichter vom Alkohol abgesaugt und mit Äther gewaschen. Das Präparat ist nach dem Trocknen über Schwefelsäure ein schneeweißes Pulver, das gewöhnlich ungefähr 25% des ölfreien Mehles oder 12% der Mandel in natürlichem Zustande entspricht.

b) Eigenschaften des Amandins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 51·4, H 6·9, N 19, S 0·4, O 22·3%.

Löslichkeit[1]). Das nach obigen Angaben bereitete Amandin bildet mit kaltem Wasser eine gummiartige, plastische Masse und löst sich in geringem Maße. In Wasser von zirka 98° bildet Amandin eine durchsichtige, schleimige Masse. Ein beträchtlicher Teil löst sich und scheidet sich beim Abkühlen wieder ab. Die Lösung in heißem Wasser wird beim Sieden leicht trübe. Dieser lösliche Teil des Präparates ist wahrscheinlich eine Verbindung des Amandins, der saurer ist als der unlösliche Teil. Der Niederschlag, der sich beim Abkühlen der heißen wässerigen Lösung bildet, ist nach Zusatz von wenig Salpetersäure völlig löslich, wird mehr Salpetersäure zugefügt, so fällt ein Niederschlag, der sich beim Erwärmen ähnlich wie eine Proteose löst und in der Kälte wieder erscheint. Amandin wird in Kochsalzlösung bei Sättigung mit Natriumchlorid nicht ausgefällt. Auch mit Merkurichlorid wird aus der Natriumchloridlösung des Amandins nichts abgeschieden.

Hitzekoagulation[1]). Eine 10%ige Kochsalzlösung, die 5% Amandin enthält, wird trübe, wenn sie auf 75° erhitzt wird. Bei 80° findet geringe Flockenbildung statt, die beim allmählichen Steigen der Temperatur intensiver wird. Doch wird selbst beim Sieden nur ein kleiner Teil des Amandins koaguliert.

Spezifische Drehung[2]). In 10%iger Kochsalzlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -56{\cdot}4^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[3]). Aus einer 1 Zehntel gesättigten Ammonsulfatlösung wird Amandin nach *Hofmeisters* Be-

[1]) *Osborne* and *Campbell*: Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chem. Soc. **18**. 609 (1896).

[2]) *Osborne* and *Harris*: Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

stimmungsmethode zwischen 3·5 und 5·3 cm^3 gefällt, was 28 bis 44% wirklicher Sättigung entspricht.

F a r b r e a k t i o n e n. Amandin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine. Die *Molisch*sche Reaktion ist bei sorgfältig gereinigten Präparaten nur sehr schwach und ist wahrscheinlich durch eine schwer zu entfernende Spur von Verunreinigung verursacht.

G e h a l t a n A m i n o s ä u r e n: vgl. [1]).

S t i c k s t o f f v e r t e i l u n g[2]). N als NH_3 3·05, basischer N 4·15, nicht basischer N 11·55, N im Mg O-Niederschlag 0·17%.

6. J u g l a n s i n a u s W a l n u ß (J u g l a n s r e g i a).

Die Walnuß enthält eine große Menge Globulin, das leicht aus dem ölfreien Mehl der Kerne gewonnen werden kann. Es ist jedoch notwendig, vor der Extraktion die äußeren Samenhäute zu entfernen, denn diese enthalten so viel Tannin, daß dadurch fast sämtliches Protein unlöslich wird.

a) Darstellung des Juglansins.

Die Nußschalen werden mit der Hand entfernt und die Kerne während einiger Sekunden in heißes Wasser getaucht, bis die Häute gelockert werden. Diese werden dann mit einem Messer abgezogen und die Kerne schnell getrocknet, indem man sie auf Filtrierpapier oder sonst eine absorbierende Substanz legt. Die Kerne werden hierauf von der größeren Menge ihres Öles befreit, entweder in der Fruchtpresseoder durch Zermahlen und Auspressen und nachherige Extraktion mit Petroläther oder Äther. Das Mehl wird dann in der Kaffeemühle zu einem feinen Pulver zermahlen. 1 *kg* Mehl wird mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung behandelt und der Auszug nach C. 3 filtriert. Das klare Extrakt wird dann mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag auf gehärtete Faltenfilter gebracht und über Nacht der Filtration überlassen. Der Niederschlag wird dann in 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung gelöst, die Lösung klar filtriert und dann 5 Tage lang dialysiert.

Der Inhalt des Dialysators wird in einem Zylinder gebracht und absetzen gelassen. Die Lösung wird dann abgehebert, der Niederschlag in 2 *l* 10%iger Natriumchloridlösung gelöst Die resultierende Lösung wird noch einmal klar filtriert und noch einmal 5 Tage lang dialysiert. Der Inhalt des Dialysators wird dann

[1]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Amandin from the Almond. Amer. Journ. of Physiol. **20**. 470 (1908).

[2]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Soc. **25**. 323 (1903).

wieder in einen Zylinder gegossen. Nach dem Absetzen des Proteins wird die Lösung abgehebert und der Niederschlag auf einer gehärteten Papierschicht in einen *Büchner*schen Trichter so trocken wie möglich abgesaugt.

Das Juglansin wird dann durch Suspension in 0·5%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Suspension wird durch ein Koliertuch gegossen und nach dem Absetzen und Abhebern der größten Menge der Lösung auf einem *Büchner*-Ttrichter trocken gesaugt. Das so gewonnene Juglansin entwässert man dann durch sukzessives Waschen mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol. Schließlich wird Äther zugegeben und das Protein in einem warmen Luftstrom oder über Schwefelsäure im Exsikkator getrocknet.

Die Ausbeute beträgt nach dieser Methode ungefähr 200 *g* oder 20% des ölfreien Mehles. Das so bereitete Juglansin bildet ein schneeweißes, dichtes Pulver.

b) Eigenschaften des Juglansins.

Elementare Zusammensetzung[1], [2]. C 50·80; H 6·84; N 18·96; S 0·80; O 22·50%.

Löslichkeit[1]. Juglansin ist in Wasser unlöslich, aber leicht löslich in neutralen Salzlösungen und in sehr stark verdünnten Säuren und Alkalien. In Lösungen, die mit 10%iger Natriumchloridlösung erhalten worden sind, werden durch Sättigung mit Kochsalz geringe Fällungen erzeugt. Reichlichere Niederschläge bilden sich durch Sättigung mit Magnesiumsulfat.

Hitzekoagulation[1]. 5% Juglansin, in 10%iger Kochsalzlösung aufgelöst, geben beim Erhitzen auf 80° eine leichte Trübung und bei 99° ein flockiges Koagulum. Beim Sieden koaguliert etwas mehr, doch wird Juglansin durch Hitze nur sehr langsam und unvollständig koaguliert.

Spezifische Drehung[3]. In 10%iger Kochsalzlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -45{\cdot}21^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[4]. In 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung erfolgt die Fällung nach der Bestimmungsmethode von *Hofmeister* zwischen 2·8 cm^3 und 4·6 cm^3, was 21·7% und 36·4% wirklicher Sättigung entspricht.

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*: Conglutin and Vitellin. Journ. Amer. Chem. Soc. **18**. 609 (1896).

[2]) *Osborne* and *Harris*: The Globulin of the English Walnut, the American Black Walnut and the Butternut. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 848 (1903).

[3]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of Some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[4]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

Farbenreaktionen. Juglansin gibt mit Ausnahme der *Molisch*schen Reaktion die üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Der Gehalt des Juglansins an Aminosäuren ist noch nicht bestimmt worden.

Stickstoffverteilung[1], [2]. (J. nigra) N als NH_3 1·77, basischer N 5·61, nicht basischer N 11·33, N im Mg O-Niederschlag 0·19%.

7. Globulin aus Kokosnuß.

Das Endosperm der Kokosnuß (Cocos nucifera) enthält ein Globulin, welches krystallinisch erhalten werden kann[3].

a) Darstellung des Globulins.

Das bei 50° im Luftstrom getrocknete, vom Öl durch Pressen befreite Endosperm der Nüsse wird zermahlen und eine Woche lang bei 1 bis 3° mit 10%iger Kochsalzlösung digeriert Der durch Leinen gepreßte Saft wird nochmals mit der gleichen Mehlmenge angesetzt, wieder abgepreßt und klar filtriert. Das Globulin wird aus der Flüssigkeit durch 7 bis 10tägiges Dialysieren gegen fließendes Wasser ausgefällt, sodann wird es mit destilliertem Wasser, 50%igem Alkohol, absolutem Alkohol und Äther gewaschen und schließlich bei 110° im Vakuum getrocknet[4]. Verunreinigungen durch mitgefällte Kohlehydrate werden durch Digerieren mit Ptyalin oder Diastase bei zirka 45° entfernt.

b) Eigenschaften des Globulins.

Elementare Zusammensetzung[5]. C 51·23; H 6·90; N 18·40; S 1·06; O 22·41%.

Stickstoffverteilung[6], [7]. N als NH_3 1·36; basischer N 6·06; nicht basischer N 10·92; N im Mg O-Niederschlag 0·14%.

8. Legumin aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia faba), Wicke (Vicia sativa).

Der Name Legumin wurde früher benützt, um die Proteinsubstanz aus einer großen Zahl verschiedener Leguminosensamen zu

---

[1]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[2]) *C. O. Johs, A. I. Finks* und *C. E. F. Gersdorf:* Globulin der Kokosnuß. Journ. of Biolog. Chem. **37** 149 (1919).

[3]) *Kirkwood* und *Gies*: Bulletin Torrey Botanical Club. **29**. 321 (1902).

[4]) *C. O. Johns, A. I. Finks* und *C. E. F. Gersdorf*: Globulin der Kokosnuß. Journ. of Biolog. Chem. **37**. 149 (1919).

[5]) *Chittenden*: Medical Record. **45**. 449 (1894).

[6]) *Osborne* and *Harris*: Journ. of the Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

bezeichnen, aber spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Präparate aus vielen dieser Samen deutliche Unterschiede zeigen.

Die Präparate jedoch, welche aus der Erbse (P i s u m s a t i v u m), Saubohne (V i c i a f a b a), Linse (E r v u m l e n s) und Wicke (V i c i a s a t i v a) erhalten werden, zeigen gleiche elementare Zusammensetzung und gleiche Reaktionen, und da der Name Legumin zuerst benützt worden war, um diese Samenproteine zu bezeichnen, ist dieser Name für das hauptsächliche, aus ihnen erhaltene Protein reserviert worden.

Daß das Legumin aller dieser Samen wirklich identisch ist, ist unwahrscheinlich gemacht worden durch die Ergebnisse der Hydrolyse von aus Erbsen und Wicken gewonnenen Präparaten. Obgleich die Mengen der aus beiden Präparaten erhaltenen Aminosäuren nahezu dieselben sind, scheinen die gefundenen Unterschiede dennoch die wahrscheinlichen Grenzen der Analysenirrtümer zu überschreiten. Jedoch scheint es in Erwägung der großen Ähnlichkeit der Präparate aus den vier oben genannten Samen am besten, sei vorläufigals Legumin zu bezeichnen.

Die Leguminpräparate, die hier beschrieben werden, sind Proteinsalze, welche die Eigenschaften von Globulinen besitzen. Wird das Legumin durch Neutralisation gegen Phenolphthalein von der gebundenen Säure befreit, so wird es löslich in Wasser. Dies erklärt die Tatsache, daß Wasser das Legumin aus frisch gemahlenen Samen extrahiert und daß das Extrakt beim Stehen das gelöste Protein abscheidet, weil sich im Extrakt Säure entwickelt. Es war früher angenommen worden, daß das Legumin durch die lösende Wirkung der Alkaliphosphate in Lösung gebracht werde und daß die Hinzufügung von Säure durch Neutralisation Fällung erzeugt. Aus diesem Grunde nannte *Liebig* dieses Protein „Pflanzenkasein“.

Es war wiederholt behauptet worden, daß das Legumin phosphorhaltig sei; wenn es aber sorgfältig gereinigt wird, kann es vollständig phosphorfrei erhalten werden. Es ist darum kein Nukleoprotein oder Nukleoalbumin.

Das Legumin bildet nur einen Teil des Proteins dieser Samen. In den Samen der Saubohne, der Linse und Erbse findet es sich zusammen mit einem anderen Globulin von ähnlichen Eigenschaften und ähnlicher Zusammensetzung. Dieses ist löslicher in sehr verdünnten Salzlösungen und sehr hoch konzentrierten Ammonsulfatlösungen. Dieses letztere Globulin, das Vizilin genannt worden ist, ist in den Samen der Wicken nicht gefunden worden. Alle 4 Samensorten enthalten auch ein Protein, das weder durch Dialyse noch durch Verdünnung aus den Salzlösungen gefällt wird. Beim Erwärmen desselben auf 80° scheidet es sich jedoch ab. Dieses Protein,

Legumelin, hat die Eigenschaften eines Albumins. Alle 4 Samenarten geben auch eine kleine Menge von Proteosen[1]).

a) Darstellung des Wickenlegumins.

Legumin wird am leichtesten aus den Samen der Wicke erhalten, da diese kein Vizilin enthalten, von dem das Legumin nur schwierig völlig getrennt werden kann.

Die Samen aller hier genannten Spezies werden zur Extraktion nach A. vorbereitet.

1 *kg* Wickenmehl wird mit 4 *l* 10%iger Kochsalzlösung gemischt, die genügend Baryt enthält, um das Extrakt gegen Lackmus neutral zu machen. Die notwendige Menge Baryt wird bestimmt, indem man eine Portion von 100 *g* Mehl für sich mit einer Menge kalt gesättigter Barytlösung neutralisiert.

Die berechnete Menge Barytlösung wird dann mit einem gleichen Volumen 20%iger Natriumchloridlösung gemischt und die Mischung mit einer 10%igen Kochsalzlösung auf 4 *l* gebracht. Nachdem man das Mehl tüchtig mit der Salzlösung gemischt hat, wird sofort alles nach C. 3 behandelt. Der nach C. 1 filtrierte Auszug wird dann mit Ammoniumsulfat gesättigt und die Fällung auf einem großen Faltenfilter von gehärtetem Papier filtriert. Der Niederschlag wird zusammen mit der anhaftenden Ammonsulfatlösung nach E. 3 behandelt und die erhaltene Lösung von der kleinen Menge gewöhnlich darin enthaltener unlöslicher Stoffe abfiltriert (C. 1).

Die klare Lösung wird 3 Tage lang in laufendem Wasser dialysiert. Der Inhalt des Dialysators wird in einen Zylinder gebracht, absetzen gelassen, die Lösung abgehebert und der Niederschlag auf einem mit gehärtetem Papier belegten *Buchner*schen Trichter so trocken wie möglich gesogen. Der Niederschlag von rohem Legumin wird dann in 10%iger Kochsalzlösung gelöst die Lösung, wenn nötig, völlig klar filtriert und das Legumin durch 4tägige Dialyse in laufendem Wasser gefällt.

Die einzigen anderen im Extrakt der Wickensamen enthaltenen Proteine sind eine verhältnismäßig geringe Menge von Legumelin und sehr wenig Proteosen. Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Legumin ist daher nahezu rein. Die Gegenwart von beigemischtem Legumelin wird durch Lösen einer Probe des Präparates in 10%iger Kochsalzlösung und Erwärmen auf 80° in einem Wasserbad nachgewiesen. Ist Legumelin vorhanden, so wird es koagulieren.

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*: Legumin and other Proteids of the Pea and Vetch. Journ. Amer. Chem. Soc. **18**. 583 (1896); dieselben: Proteids of the Pea. Ibid. **20**. 348 (1898); dieselben: Proteids of the Lentil. Ibid. **20**. 362 (1898); dieselben: Proteids of the Horse Bean. Ibid. 393 (1898); dieselben: Proteids of the Vetch. Ibid. **20**. 406 (1908); dieselben: Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Ibid. **20**. 410 (1898).

Wenn eine weitere Reinigung des Legumins erwünscht wird, kann dieses durch Wiederholung der Fällung durch Dialyse erzielt werden oder durch Fällung seiner Natriumchloridlösung mittels Verdünnung mit so viel kaltem destillierten Wasser, daß der Gehalt an Kochsalz auf 1% oder weniger gebracht wird.

b) Darstellung des Legumins aus der Erbse, Saubohne und Linse.

Man behandelt 1 *kg* feines Mehl mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung, die genügend Baryumhydroxyd enthält, um die Lösung gegen Lackmus zu neutralisieren. Der Auszug wird völlig klar filtriert, dann mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag nach E. 3 gelöst.

Die resultierende Lösung wird dann dialysiert, bis sämtliches Globulin gefällt ist. Dieser Punkt kann bestimmt werden, wenn man ein wenig des filtrierten Dialysatorinhaltes in ein großes Volumen destillierten Wassers bringt. Wenn durch die so filtrierte Lösung keine Trübung erfolgt, werden die gefällten Globuline auf gehärteten Faltenfiltern abfiltriert. Der Niederschlag, der eine Mischung von Legumin und Vizilin ist, wird dann in 1 *l* Wasser suspendiert und durch Zusatz von 76 *g* Ammoniumsulfatkristallen gelöst.

Die resultierende Lösung wird, ohne von der gewöhnlich vorhandenen kleinen Menge unlöslichen Proteins abzufiltrieren, durch Lösen von 380 *g* Ammonsulfatkristallen auf 6 Zehntel-Sättigung gebracht. Der Niederschlag wird dann auf einem Faltentrichter von gehärtetem Papier abfiltriert und von anhaftendem Sulfat durch Pressen zwischen Filtrierpapier befreit. Das Filtrat dieses Niederschlages enthält praktisch sämtliches Vizilin. Soll dieses Protein gewonnen werden, so wird nach S. 424 verfahren. Um das Vizilin so vollständig als möglich zu trennen, ist es nötig, die anhaftende Sulfatlösung so sorgfältig wie möglich zu entfernen. Die kleine, am Niederschlag haftende Menge Vizilin wird durch die nachfolgende Behandlung abgetrennt. Der Niederschlag wird dann nach E. 2 gelöst und das Gesamtvolumen auf 1 *l* gebracht. 450 *g* Ammoniumsulfat werden dann zugefügt und die Lösung hiedurch auf nahezu 6 Zehntel-Sättigung gebracht.

Der Niederschlag wird dann in 10%iger Kochsalzlösung nach E. 2 gelöst, die Lösung völlig klar filtriert eventuell 3 Tage lang in laufendem Wasser dialysiert. Die verdünnte Salzlösung, die man so bekommt, enthält etwas Legumin und alles Vizilin und Legumelin. Das gefällte Legumin wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert, mit Wasser chlorfrei gewaschen, mit absolutem Alkohol entwässert, mit Äther extrahiert und getrocknet.

c) *Eigenschaften des Legumins.*

Elementare Zusammensetzung[1]).

Legumin Wicke	C 51·69; H 6·99; N[1]) 18·02; S 0·43; O 22·87.
Legumin Soubohne	C 51·72; H 7·01; N[1]) 18·06; S 0·39; O 22·82.
Legumin Linse	C 51·73; H 6·89; N[1]) 18·06; S 0·40; O 22·92.
Legumin Erbse	C 51·74; H 6·90; N[1]) 18·04; S 0·42; O 22·90.

Löslichkeit[2]). Das nach der beschriebenen Methode dargestellte Legumin ist in Wasser unlöslich, aber in Kochsalzlösungen von 2 und mehr Prozent löslich. In stark verdünnten Salzlösungen ist es nur wenig löslich. Wird es von gebundener Säure durch Neutralisation gegen Phenolphthalein befreit, so ist das Legumin löslich in Wasser[3]). Salzlösungen von Legumin werden durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat nicht gefällt.

Hitzekoagulation[4]). Wenn Legumin völlig frei von Vizilin und Legumelin ist, so kann man seine Natriumchloridlösungen einige Zeitlang kochen, ohne daß Trübung auftritt. Wenn jedoch vorher ein wenig Essigsäure zugefügt wird, so erfolgt beim Sieden eine intensive Koagulation.

Spezifische Drehung[5]). Das Legumin der Saubohne zeigt in 10%iger Kochsalzlösung $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -43{\cdot}64^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[6]). Nach der beschriebenen Methode dargestellte Leguminpräparate werden nach *Hofmeisters* Bestimmungsweise zwischen 5·5 und 7·5 *cm*³ gefällt, d. h. zwischen 46 und 67% wirklicher Sättigung.

Farbenreaktionen. Legumin gibt alle Farbenreaktionen der Proteine. Die Reaktion mit *Molisch*schem Reagens ist schwach und bei verschiedenen Präparaten verschieden stark. Es

---

[1]) N = Stickstoff nach der Methode von *Dumas*.

[2]) *Osborne* und *Campbell*: The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chem. Soc. **20**. 410 (1898).

[3]) *Osborne*: Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins gegen bestimmte Mengen von Säure und Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 240 (1901).

[4]) *Osborne* and *Campbell*: The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chem. Soc. **20**. 410 (1898).

[5]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some Vegetable Preteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[6]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

ist daher wahrscheinlich, daß diese Reaktion durch eine sehr geringe Verunreinigung verursacht wird.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1]) und [2]).

Stickstoffverteilung[3]). Erbse: N als NH_3 1·69; basischer N 5·11; nicht basischer N 10·97; N im Mg O-Niederschlag 0·27 %.

Linse: N als NH_3 1·69; basischer N 5·16; nicht basischer N 11·03; N im Mg O-Niederschlag 0·11.

Saubohne: N als NH_3 1·62; basischer N 4·92; nicht basischer N 11·34; N im Mg O-Niederschlag 0·11.

Wicke: N als NH_3 1·75; basischer N 5·17; nicht basischer N 10·90; N im Mg O-Niederschlag 0·18.

* * *

In einem gewissen Gegensatze zu diesen Aufgaben über das Legumin, welche lediglich den Untersuchungen *Osbornes* folgen, stehen einige Ergebnisse von *O. Hammarsten*[4]), welcher neben einem phosphorfreien, von ihm α-Legumin genannten und mit dem bisher geschilderten identischen Protein noch ein phosphorhaltiges β-Legumin dargestellt hat. Dieses β-Legumin ist nicht ein durch Alkalibehandlung unlöslich gewordenes α-Legumin; es tritt auch bei Extraktion des Erbsenmehles ohne Alkali auf.

Ohne auf die hiedurch wieder aufgeworfene Kontroverse gegenüber *Ritthausens* älteren Angaben einzugehen, sei die Darstellungsmethode der beiden Proteine nach *Hammarsten* geschildert

Meistens wurden 150 *g* Erbsenmehl mit 3 *l* ammoniakhaltigem Wasser (gewöhnlich 0·014 %, nie mehr als 0·016 %) extrahiert. Das Filtrat wurde mit Salzsäure (spezifisches Gewicht 1·127; 0·1 bis 0·2 cm^3 auf je 100 cm^3 Filtrat) gefällt. Die Salzsäuremenge schwankte also zwischen 0·028 und 0·056 %, war aber meistens 0·056 %. Auch die Anwendung von Essigsäure (0·15 %) führte zum Ziel. Es hat sich dabei herausgestellt, daß für die Darstellung des α-Legumins die größere Säuremenge, für die direkte Darstellung des β-Legumins umgekehrt die kleinere vorteilhaft ist.

Zur Darstellung des α-Legumins wurde die mit Wasser ausgewaschene Rohfällung mit NaCl-Lösung von 8 % extrahiert und das klare Filtrat mit Wasser bis zu einem Salzgehalt von 1 % verdünnt. Die Fällung wurde abzentrifugiert, in Kochsalzlösung

[1]) *Osborne* and *Heyl*: Hydrolysis of Vetch Legumin. Amer. Journ. of Physiol. **22**. 423 (1908).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Legumin from the Pea. Journ. of Biolog. Chem. **3**. 219 (1907).

[3]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[4]) *Olaf Hammarstein*: Einige Bemerkungen über das Erbsenlegumin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **102**. 85 (1918).

wieder gelöst und wieder mit Wasser bis zu einem Gehalte von 1% NaCl verdünnt (Entfernung des Vizilins). Die Fällung wird durch feine Verteilung in Wasser und Zentrifugieren gewaschen, bis die Bildung einer milchigen Trübung das Verschwinden des Kochsalzes anzeigt. Nun wurde von dem Bodensatz (welcher ebenfalls in α-Legumin übergeführt werden kann) getrennt und die Flüssigkeit durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak (0·5%) gefällt; die Fällung wurde mit Wasser ausgewaschen.

Zur Darstellung des b-Legumins wurde die mit wenig Säure aus Erbsenmehlextrakt erhaltene Fällung mit Kochsalzlösung möglichst erschöpft und dann mit Wasser gewaschen. Dann wurde der Rückstand mit so viel Wasser versetzt, daß nach dem Stehen in der Kälte über Nacht eine filtrierbare oder kolierbare Lösung des b-Legumins erhalten wurde. Diese Lösung wurde mit Ammoniak gefällt, erst mit Wasser, dann mit Kochsalzlösung und schließlich wieder mit Wasser gründlich gewaschen.

Weitere Angaben über die beiden Substanzen hat *Hammarsten* nicht gemacht.

9. Vizilin aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia fava).

Vizilin, das einen Teil der Globuline der Erbse, Linse und Saubohne bildet, unterscheidet sich in Zusammensetzung und Eigenschaften vom Legumin und ist eine verschiedene Substanz.

Vizilin enthält ein wenig mehr Kohlenstoff, etwas weniger Stickstoff und weniger als halb so viel Schwefel wie Legumin; es ist löslicher in verdünnten Salzlösungen und durch Ammonsulfat weniger leicht wie das Legumin fällbar. Seine Ähnlichkeit mit dem Legumin läßt eine genetische Verwandtschaft vermuten, aber seine Abwesenheit im Wickensamen zeigt, daß dies offenbar nicht der Fall ist.

Von den drei oben erwähnten Samen sind zahlreiche Vizilinpräparate erhalten worden, die in bezug auf Eigenschaften und Zusammensetzung sehr nahe miteinander übereinstimmen.

Vizilin bietet besonderes Interesse, da es weniger Schwefel enthält als irgendein anderes bekanntes Protein. Der Schwefelgehalt einer großen Zahl von Präparaten liegt zwischen 0·1 und 0·25%. Ein Teil dieses Schwefels gibt, wie der Schwefel aller anderen Proteine, beim Sieden mit Ätzkali Sulfide.

Vizilin kann aus den Kochsalzlösungen durch fraktionierte Fällung vom Legumin getrennt werden. Diese Methode bedingt aber Verlust an Substanz und erfordert viel Zeit. Es wird leichter durch Fällung mit Ammonsulfat vom Legumin getrennt, denn bei 6 Zehntel-Sättigung wird das Legumin gefällt, während Vizilin erst bei 7 Zehntel-Sättigung ausfällt.

a) Darstellung des Vizilins.

Vizilin wird am besten aus dem Filtrat der in 6 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung erfolgten ersten Leguminfällung erhalten (vgl. S. 420). Dieses Filtrat wird mit Ammonsulfatlösung gesättigt, der Niederschlag auf einem gehärteten Faltenfilter filtriert, das anhaftende Sulfat so gut wie möglich durch Pressen zwischen Filtrierpapier entfernt und dann in 1 *l* Wasser gelöst. 400 *g* kristallisiertes Ammonsulfat werden dann in der Lösung gelöst. Dies genügt, um im Verein mit der am Niederschlag haftenden gesättigten Sulfatlösung die Konzentration des Salzes auf nahezu 6 Zehntel-Sättigung zu bringen.

Wenn ein Niederschlag von wenig Legumin gebildet wird, wird dieser abfiltriert und das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt. Der Niederschlag von Vizilin, der sich nach der Sättigung mit Ammonsulfat abscheidet, wird dann in Wasser gelöst und die filtrierte Lösung so lange dialysiert, bis eine Probe beim Eingießen in reines Wasser keine Trübung mehr gibt.

Der durch Dialyse gebildete Niederschlag von Vizilin wird dann auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt, mit Wasser und dann mit Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol entwässert, mit trockenem Äther gewaschen und zuletzt im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

b) Eigenschaften des Vizilins[1]).

Elementare Zusammensetzung.

Vizilin Erbse	C 52·36; H 7·03; N 17·05; S 0·18; O 23·38.
Vizilin Linse	C 52·13; H 7·02; N 17·24; S 0·17; O 23·44.
Vizilin Saubohne	C 52·38; H 7·04; N 17·52; S 0·15; O 23·39.

Löslichkeit. Vor dem Trocknen ist Vizilin unlöslich in Wasser, doch ist es reichlich löslich in 1 bis 2%igen Kochsalzlösungen. Nach Behandeln mit Alkohol und Trocknen über Schwefelsäure ist gewöhnlich ein großer Teil des Präparates in Salzlösungen unlöslich geworden.

Hitzekoagulation. Vizilinlösungen in 10%iger Kochsalzlösung werden bei 90° trübe, bei 95° scheiden sich Flocken ab. Bei andauerndem Erhitzen auf 100° wird Vizilin beinahe völlig koaguliert.

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*: The Proteids of the Pea, Lentil, Horse Bean and Vetch. Journ. Amer. Chem. Soc. **20**. 410 (1898).



Spezifische Drehung wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat. Infolge der Schwierigkeit der völligen Trennung von Vizilin und Legumin sind die Fällungsgrenzen nicht genau bestimmt worden. Vizilin wird meist zwischen 7 und 8 Zehntel wirklicher Sättigung ausgefällt.

Farbenreaktionen. Vizilin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine. Die Reaktionen mit *Molischs* Reagens variieren bei den verschiedenen Präparaten so stark, daß es wahrscheinlich ist, daß diese Reaktion von einer leichten Verunreinigung durch Kohlehydrate herrührt.

Gehalt an Aminosäuren: Vizilin (Erbse): vgl.[1]).

Stickstoffverteilung[2]). Erbse: N als NH_3 1·67, basischer N 4·92, nicht basischer N 10·58, N im Mg O-Niederschlag 0·23%.

Linse: N als NH_3 1·75, basischer N 4·59, nicht basischer N 10·67, N im Mg O-Niederschlag 0·13%.

Saubohne: N als NH_3 1·93, basischer N 4·53, nicht basischer N 10·35, N im Mg O-Niederschlag 0·23%.

10. Phaseolin aus Bohnen (Phaseolus vulgaris).

Phaseolin, das beinahe die ganze Proteinsubstanz dieses Samens bildet, ist ein Globulin, das in verhältnismäßig verdünnten Salzlösungen löslich ist. Es war früher mit dem Legumin anderer Spezies von Leguminosensamen identifiziert worden. Da aber später es Studium gezeigt hat, daß es von anderen, auf ähnliche Weise erhaltenen Proteinen anderer Genera der Leguminosen verschieden ist, wurde es Phaseolin genannt[3]).

Es waren einige Male Phaseolinpräparate dargestellt worden, die hauptsächlich aus oktaedrischen Kristallen bestanden. Es konnte aber kein Präparat gewonnen werden, das nur Kristalle aufwies. Die Kristallisationsbedingungen sind derart, daß es nicht möglich ist, eine Methode zu beschreiben, die ein wohlcharakterisiertes Produkt gibt.

In den Bohnenextrakten ist auch ein leichter lösliches Globulin, Phaselin, und etwas Proteose enthalten.

Fraktionierte Fällungen des Phaseolins ergaben unter verschiedenen Bedingungen Produkte von konstanter Zusammensetzung[4]).

---

[1]) *Osborne* and *Heyl*: Hydrolysis of Vicilin from the Pea (Pisum sativum). Journ. of Biolog. Chem. **5**. 187 (1908).

[2]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[3]) *Osborne*: Proteids of the Kidney bean. Journ. Amer. Chem. Soc. **16**. 633, 703, 757 (1894).

[4]) cf. *Osborne*: l. c.; *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. **18**. 295 (1907).

a) Darstellung des Phaseolins.

Die Bohnen werden grob gemahlen und vom größeren Teil ihrer äußeren Samenhäute durch Sieben durch ein grobes Sieb befreit. Dem groben Mehl wird dann der größte Teil seines Ölgehaltes durch Extraktion mit Petroläther entzogen. Nachdem der Petroläther entfernt ist, wird das grobe Mehl noch einmal zu einem möglichst feinen Pulver gemahlen. Die meisten zurückbleibenden Samenhäute werden durch Sieben entfernt.

1 *kg* des fein gemahlenen Mehles wird mit 4 *l* 2%iger, auf 80° erwärmter Kochsalzlösung behandelt. Die Mischung von Mehl und Lösungsmittel wird wiederholt umgerührt und mindestens 3 Stunden stehen gelassen, denn beim sofortigen Filtrieren scheidet sich aus dem Extrakt eine Substanz ab, welche die Filtration sehr erschwert. Die Abscheidung dieser Substanz vor der Filtration erleichtert diesen Prozeß sehr. Die Mischung wird dann auf Faltenfilter (*Schleicher-Schüll*, Nr. 580, 50 *cm*) mit gehärteten Spitzen gebracht. Wenn ein beträchtlicher Teil der Lösung abfiltriert ist, wird der Rückstand ausgepreßt und der Auszug völlig klar filtriert.

Die Lösung muß im durchfallenden Licht frei von sichtbaren Bestandteilen sein, im reflektierten Licht ist sie etwas opaleszent. Sie wird 4 Tage im laufenden Wasser dialysiert. Der gebildete Niederschlag wird aus dem Dialysator entfernt, absitzen gelassen, die überstehende Flüssigkeit abgehebert und der Niederschlag auf einer Schicht gehärteten Filtrierpapiers im *Buchner*schen Trichter filtriert.

Nachdem man so trocken als möglich abgesaugt hat, wird das Phaseolin vom Papier weggenommen, in Wasser suspendiert und durch ein Siebtuch gegossen, um eine feine Verteilung zu erzielen. Das Volumen der Suspension wird auf zirka 800 cm^3 gebracht und das Globulin durch Zusatz eines gleichen Volumens 10%iger Natriumchloridlösung in Lösung gebracht. Es soll eine fast klare Lösung entstehen. Diese wird 4 Tage lang dialysiert und der gebildete Niederschlag nach obiger Beschreibung wieder gelöst. Die Lösung wird dann stehen gelassen, damit sich unlösliche Teile absetzen können. Dann wird, wenn nötig, völlig klar filtriert.

Die klare Lösung wird 4 Tage lang dialysiert. Der gebildete Niederschlag absetzen gelassen und in einem *Buchner*schen Trichter auf einer Schicht gehärteten Papieres gesammelt. Das Phaseolin wird durch zweimalige Suspension in destilliertem Wasser gewaschen und auf einem *Buchner*schen Trichter so trocken wie möglich gesogen, hierauf mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Das so zubereitete Phaseolin ist ein dichtes, schneeweißes Pulver. Nach der vorhergehenden Darstellungsmethode werden das

leichter lösliche Phaselin und die Proteose aus dem Phaseolin entfernt.

b) Eigenschaften des Phaseolins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·66; H 6·94; N 15·84; S 0·34; O 24·22%.

Löslichkeit[2]). Unlöslich in Wasser, löslich in sehr verdünnten Salzlösungen und in sehr verdünnten Säuren und Alkalien. In 10%iger Kochsalzlösung wird es durch geringe Mengen Essigsäure, Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure nicht gefällt, hingegen wird es mit Salzsäure aus 1%iger Natriumchloridlösung abgeschieden. In 10%iger Kochsalzlösung wird es durch Sättigung mit Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat nur wenig gefällt.

Hitzekoagulation[2]). In 10%iger Natriumchloridlösung erfolgt bei 95° Trübung, die bei steigender Temperatur langsam zunimmt. Nach einigem Erhitzen scheidet sich ein flockiges Koagulum ab, das aber selbst nach einstündigem Erhitzen geringfügig bleibt.

Spezifische Drehung[3]). In 10%iger Kochsalzlösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -41{\cdot}46^0$.

Fällung mit Ammonsulfat[4]). In 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung mit 6·5 cm^3 und ist vollständig mit 8·2 cm^3, wenn nach *Hofmeisters* Methode verfahren wird. Dies entspricht 57·3 und 77·3% wirklicher Sättigung.

Farbenreaktionen. Phaseolin gibt alle üblichen Farbreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [5]) und [6]).

Stickstoffverteilung[7]). N als NH_3 1·70; basischer N 3·62; nicht basischer N 10·20; N im MgO-Niederschlag 0·33%.

[1]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. **18**. 295 (1907).

[2]) *Osborne*: The Proteids of the Kidney Bean. Journ. Amer. Chem. Soc. **16**. 633, 703, 757 (1894).

[3]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[4]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits of some Vegetable Proteins with Ammonium Sulphate. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

[5]) *E. Abderhalden* und *B. Babkin*: Die Monoaminosäuren des Legumins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **47**. 354 (1906).

[6]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Phaseolin. Amer. Journ. of Physiol. **18**. 295 (1907).

[7]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

11. Glyzinin aus Soyabohne (Glycine hispida).

Das hauptsächliche Protein der Soyabohne ist ein Globulin, das in Eigenschaften und Zusammensetzung dem Legumin sehr ähnlich ist. Es ist jedoch in mancher Hinsicht von allen anderen aus Leguminosen erhaltenen Proteinen verschieden und besitzt daher den Namen Glyzinin.

Häufige fraktionierte Fällungen dieses Globulins ergaben Produkte von sehr konstanter elementarer Zusammensetzung[1]).

Neben Glyzinin scheint die Soyabohne eine kleine Menge eines anderen, leichter löslichen Globulins zu enthalten, ferner etwas Legumelin und sehr wenig Proteose.

a) Darstellung des Glyzinins.

Die Samen werden zunächst grob gemahlen, wobei ein großer Teil ihrer äußeren Samenhaut in großen Stücken entfernt wird. Diese werden größtenteils durch einen Luftstrom entfernt oder, indem man das zermahlene Material mit der Hand auf ein 8 bis 10 *m* langes und zirka 1 *m* breites Tuch wirft. Hiebei werden die schwereren Stücke des Endosperms weiter geworfen als die leichten Samenhäute, so daß die letzteren sich zusammen mit kleineren Endospermstücken auf dem Tuch in der Nähe des Experimentators sammeln. Durch Wiederholung dieses Prozesses und darauffolgendes Sieben auf einem groben Sieb kann das meiste Endosperm frei von den äußeren Samenhäuten erhalten werden. Das Ganze wird dann etwas feiner gemahlen. Der Ölgehalt verhindert zunächst die Gewinnung eines feinen Mehles. Es wird zur Entfernung des größten Teiles des Öles mit Petroläther extrahiert und nun nach Befreiung von anhaftendem Petroläther so fein als möglich gemahlen.

1 *kg* feines Mehl wird mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung gemischt und der Auszug nach C. 3 filtriert. Das filtrierte Extrakt, das im durchfallenden Lichte völlig klar sein muß, ist im reflektierten Lichte stark opaleszent. Es wird 4 Tage lang dialysiert. Das gefällte Globulin wird vom Dialysator entfernt, absetzen gelassen, die überstehende Flüssigkeit abgehebert und die Fällung auf einer Papierschicht in einem großen *Buchner*schen Trichter gesammelt und so trocken wie möglich gesogen.

Der Niederschlag wird dann vom Papier entfernt und durch ein Siebtuch in Wasser suspendiert. Die Klumpen, die sich auf dem Tuch sammeln, werden durchgespült, bis das Endvolumen 800 bis 1000 cm^3 ist. Durch Zufügen eines gleichen Volumens 20%iger Kochsalzlösung wird das Globulin praktisch vollständig gelöst. Die Lösung wird dann ohne Filtration wie vorher dialysiert. Das gefällte

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*: Proteids of the Soy-Bean. Journ. Amer. Chem. Soc. **20**. 419 (1898).

Glyzinin wird in der eben beschriebenen Weise wieder gelöst. Wenn mehr als eine kleine Quantität unlöslicher Materie in der Lösung vorhanden ist, wird diese stehen gelassen, bis sich das Unlösliche abgesetzt hat. Die überstehende Flüssigkeit wird dann filtriert. Wenn so wenig unlösliches Material vorhanden ist, daß keine Gefahr besteht, daß es das Filter verstopft, wird die Lösung filtriert und die klare Lösung 4 Tage lang dialysiert.

Das gefällte Glyzinin wird dann wie vorher auf einem *Buchner*schen Trichter gesammelt, trocken gesogen, in destilliertem Wasser suspendiert absetzen gelassen, noch einmal abgesaugt und das Waschen wiederholt. Es wird dann in derselben Weise mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol gewaschen. Nach Waschen mit Äther wird das Glyzinin in einem trockenen Luftstrom oder über Schwefelsäure getrocknet. Das so erhaltene Produkt stellt ein schneeweißes, feines Pulver dar.

Durch die wiederholten Fällungen mittels Dialyse wird die kleine Menge löslichen Globulins entfernt, ebenso sämtliches Legumelin und die Proteose.

b) Eigenschaften des Glyzinins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·12; H 6·93; N 17·53; S 0·79; O 22·63%.

Löslichkeit[1]). Obgleich Wasser allein über 16% Glyzinin aus dem Mehl der Soyabohne entfernt, ist das auf beschriebene Weise zubereitete Glyzinin in reinem Wasser unlöslich, aber leicht löslich in Kochsalzlösung, die mehr als 2% dieses Salzes enthält. Es ist auch in gesättigten Kochsalz- oder Magnesiumsulfatlösungen löslich.

Hitzekoagulation[1]). In 10%iger Kochsalzlösung wird Glyzinin auch bei längerem Sieden nicht koaguliert.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat. Die Fällungsgrenzen mit diesem Salz sind nicht genau bestimmt worden. Der Kochsalzauszug der Soyabohne gibt einen reichlichen Niederschlag, wenn er mit diesem Salz 6 Zehntel gesättigt wird, aber es kann keine wohl definierte Grenze beobachtet werden, die für Glyzinin eine obere Fällungsgrenze anzeigt.

Farbenreaktionen. Glyzinin gibt alle gebräuchlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [2]).

[1]) *Osborne* and *Campbell*: Proteids of the Soy-Bean (Glicine hispida). Journ. Amer. Chem. Soc. **20**. 419 (1898).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Glyzinin. Amer. Journ. Physiol. **19**. 468 (1907).

Stickstoffverteilung[1]). N als NH_3 2·11; basischer N 3·95; nicht basischer N 11·27; N im Mg O-Niederschlag 0·12%.

12. Kanavalin und Konkanavalin aus Jackbohne (Canavalia ensiformis).

Die Jackbohne besitzt einen Gesamtproteingehalt von 23%; davon sind mit Wasser 15%, mit 2%iger Kochsalzlösung 18·5%, mit 10%iger Kochsalzlösung 18%, mit 0·2%iger Natronlauge 22·3% extrahierbar[2]). Außer einem Albumin lassen sich zwei kristallisierbare und ein nicht kristallisierbares Globulin (Konkanavalin A und B, Kanavalin) isolieren[3]).

a) Darstellung der Konkanavaline A und B.

Die möglichst fein zermahlenen Bohnen werden unter Toluolzusatz über Nacht mit dem 2·5fachen Gewicht Wasser angesetzt, sodann wird der Brei abgepreßt und der Saft klar filtriert. Das Filtrat wird gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert. Der sich bildende Niederschlag wird abgesaugt und mit so viel NaCl versetzt, daß die Konzentration 10% beträgt: hiebei löst sich das nicht kristallisierte Kanavalin sofort. Der abfiltrierte ungelöste Anteil wird mit 10%iger Kochsalzlösung gewaschen, bei 40° in ganz wenig gesättigter Kochsalzlösung gelöst und von denaturiertem Protein abfiltriert. Nach Verdünnen mit Wasser oder Dialysieren kristallisiert das Konkanavalin A. Kristalle erhält man auch durch Lösen in möglichst wenig verdünntem Ammoniak und vorsichtiges Neutralisieren mit verdünnter Essigsäure. Durch Dialysieren des ursprünglichen Filtrates vom Konkanavalin A (10%ige Kochsalzlösung) fällt das Konkanavalin B zusammen mit dem Kanavalin aus. Man suspendiert das Gemenge in viel destilliertem Wasser und löst das Kanavalin durch langsamen Zusatz von konzentrierter Kochsalzlösung. Die ungelöst bleibenden Nadeln werden abzentrifugiert, mehrmals in wenig 10%iger Kochsalzlösung zentrifugiert und schließlich in dieser Konzentration völlig gelöst. Nach dem Filtrieren der Lösung wird das Konkanavalin B durch Dialyse kristallinisch gewonnen. (Im Filtrat befindet sich Kanavalin.)

---

[1]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[2]) *D. B. Jones* und *C. O. Johns*: Einige Proteine aus der Jackbohne. Journ. of Biolog. Chem. **28**. 67 (1916).

[3]) *James B. Sumner*: Die Globuline der Jackbohne. Journ. of Biolog. Chem. **37**. 137 (1919).

b) Eigenschaften der Globuline.

Elementare Zusammensetzung.

Kanavalin: C 53·26, H 7·03, N 16·72, S 0·48.
Konkanavalin: C 53·28, H 7·02, N 16·45, S 1·10.

Stickstoffverteilung. N als NH_3 1·41; basischer N 3·17; nicht basischer N 11·55; Humin-N 0·28 (Kanavalin).

Getrennte Angaben über Konkanavalin A und B liegen noch nicht vor.

13. Vignin aus Kuherbse (Vigna sinensis).

Der größte Teil der Proteine dieses Samens besteht aus einem Globulin, welches ebenfalls ähnlich, jedoch nicht identisch mit dem Legumin ist. Da die fraktionierte Fällung dieses Proteins eine Anzahl aufeinander folgender Fraktionen von konstanter elementarer Zusammensetzung und gleichen Eigenschaften ergeben hat und da kein Anhaltspunkt dafür vorhanden ist, daß es aus einer Mischung von 2 oder mehreren verschiedenen Proteinen besteht, ist es Vignin genannt worden[1]).

Neben Vignin enthält der Auszug aus der Kuherbse eine kleine Menge eines anderen, leichter löslichen Globulins, das dem Phaseolin in Zusammensetzung und Eigenschaften sehr ähnlich ist. Ferner ist ein anderes Protein vorhanden, das dem Legumelin aus anderen Leguminosensamen gleicht.

a) Darstellung des Vignins.

Die Samen der Kuherbse werden grob gemahlen und der größere Teil der äußeren Samenhäute in der bei der Soyabohne beschriebenen Weise entfernt. Der Rest der äußeren Samenhäute wird durch allmähliches Zerkleinern und Sieben abgeschieden. Das Mehl wird zu einem feinen Pulver zermahlen. Es ist nicht nötig, das Öl aus diesem Mehl zu entfernen.

1 *kg* feines Mehl wird mit 4 *l* 5%iger Natriumchloridlösung gemischt und der Auszug gemäß C. 3 filtriert. Dann wird das klare Extrakt 3 Tage lang dialysiert der Inhalt des Dialysators entfernt und stehen gelassen, bis sich das Globulin abgesetzt hat. Die Lösung wird dann so vollständig wie möglich abgehebert und das Globulin in Wasser suspendiert, nachdem die Klumpen durch ein Siebtuch zerkleinert worden sind. Das Ganze wird dann auf ein Volumen von 1 *l* gebracht und 50 *g* Kochsalz darin aufgelöst. Die resultierende Lösung wird dann völlig klar filtriert und das

[1]) *Osborne*: The Proteids of the Cow Pea. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 494 (1897).

Filter mit 5%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Das klare Filtrat und das Waschwasser werden mit 4 Volumen destilliertem Wasser verdünnt, wobei die Konzentration des Kochsalzes auf 1% reduziert wird.

Da Vignin in 1%iger Kochsalzlösung nur wenig löslich ist, während die anderen Proteine der Kuherbse darin leicht löslich sind, wird das Vignin so ausgefällt und von dem weitaus größten Teil der übrigen Substanzen getrennt. Nachdem sich das Vignin abgesetzt hat, wird die überstehende Flüssigkeit abgehebert und der Niederschlag auf gehärteten Filtern gesammelt. Der von der Lösung befreite Niederschlag wird in Wasser suspendiert, durch ein Siebtuch gegossen und das Volumen der Suspension auf 1 *l* gebracht. 50 *g* Kochsalz werden dann in der Suspension aufgelöst und die resultierende Lösung völlig klar filtriert und 4 Tage lang dialysiert.

Der Inhalt des Dialysators wird dann in einen Topf gebracht und der Niederschlag absitzen gelassen. Die Lösung wird abgehebert, die Fällung auf eine gehärtete Papierschicht in einen *Buchner*schen Trichter gebracht, möglichst trocken gesogen, dann durch Suspension in Wasser gewaschen, durch ein Siebtuch gepreßt und auf dem *Buchner*schen Trichter abermals trocken gesogen. Nachher wird auf analoge Weise sukzessive mit 50-, 75- und 100%igem Alkohol gewaschen, der Niederschlag mit Äther extrahiert und in einem trockenen Luftstrom oder über Schwefelsäure in einem Exsikkator getrocknet.

Das resultierende Produkt ist ein dichtes, farbloses Pulver, das 45 bis 50 *g* wiegt.

b) Eigenschaften des Vignins.

Elementare Zusammensetzung[1]. C 52·64; H 6·95; N 17·25; S 0·50; O 22·66%.

Löslichkeit[1]. In Abwesenheit von Salzen löst sich Vignin in reinem Wasser in bedeutendem Maße. Zusatz von wenig Kochsalz zu dieser Lösung fällt das Vignin, das durch weiteren Salzzusatz völlig gelöst wird. In 10%iger Natriumchloridlösung braucht es zur Fällung des Vignins weniger Salzsäure als beim Phaseolin, aber mehr als beim Legumin. Eine verhältnismäßig große Quantität Essigsäure fällt das Vignin, während Phaseolin durch diese Säure gar nicht gefällt wird. Vignin ist löslich in gesättigten Natriumchlorid- oder Magnesiumsulfatlösungen.

Hitzekoagulation[1]. In 10%iger Kochsalzlösung entsteht beim Erhitzen auf 98° eine Trübung. Nach fortgesetztem Erhitzen auf dem Wasserbad gesteht die Lösung zu einer Gallerte.

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*: The Proteids of the Cow Pea. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 494 (1897).



Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammoniumsulfat. Das mit 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung extrahierte Vignin fällt erst, wenn die Lösung zu 80% mit Ammonsulfat gesättigt ist. Genauere Bestimmungen der Fällungsgrenzen sind nicht gemacht worden.

Farbenreaktionen. Vignin gibt alle üblichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1]).

Stickstoffverteilung[2]). N als NH_3 1·91; basischer N 4·28; nicht basischer N 10·81; N im Mg O-Niederschlag 0·25%.

14. Konglutin aus Lupinensamen (Lupinus).

Die Samen der verschiedenen Lupinenarten (Lupinus) enthalten eine große Quantität eines Proteins, dem durch *Ritthausen* der Name Konglutin erteilt wurde. Nur ein unbedeutender Anteil des Proteins der gelben oder blauen Lupine ist wasserlöslich, 10%ige Kochsalzlösung aber extrahiert beinahe sämtliches Protein[2]). Das so extrahierte Protein ist die als Konglutin bekannte Substanz. Weitgehende Fraktionierung des Konglutins der gelben Lupine zeigte, daß es eine Mischung zweier Globuline von verschiedener relativer Löslichkeit und verschiedener Zusammensetzung ist[3, 4]). Diese seien vorläufig als Konglutin-α und Konglutin-β bezeichnet.

Das Globulin der blauen Lupine gleicht betreffs Zusammensetzung und Eigenschaften dem weniger löslichen und häufigeren Konglutin-α der gelben Lupine, es ist aber bis jetzt noch nicht genügend fraktioniert worden, um mit genügender Sicherheit als Konglutin-α bezeichnet zu werden.

Das rohe Globulin der gelben Lupine kann aus Kochsalzlösungen durch fraktionierte Fällung oder durch fraktionierte Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat in die beiden oben erwähnten Teile getrennt werden. Das weniger lösliche Globulin wird durch Ammonsulfat leichter gefällt als das leichter lösliche Globulin. Durch diese Methode kann eine bessere Trennung erzielt werden als durch fraktionierte Fällung aus Kochsalzlösungen. Blaue und gelbe Lupinen geben große Quantitäten rohen Globulins, aber die Trennung in die beiden Komponenten bedingt große Arbeit und Verlust von beinahe der Hälfte der Substanz. Es ist nicht klar, wodurch dieser

[1]) *Osborne* and *Heyl*: Hydrolysis of Vignin. Amer. Journ. of Physiol. **22**. 362 (1908).

[2]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[3]) *Osborne* and *Campbell*: Proteins of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 454 (1897).

[4]) *Osborne* and *Harris*: Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins (Second Paper). Amer. Journ. of Physiol. **13**. 436 (1905).

Verlust verursacht wird. Es ist möglich, daß proteolytische Fermente diese schnellen Umwandlungen des Proteins bewirken. Dies kann auch die Gegenwart der leichter löslichen Fraktionen erklären.

a) Darstellung des Konglutins aus der gelben Lupine.

Die Samen werden grob gemahlen und die meisten Samenhüllen durch ein grobes Sieb entfernt. Der Rückstand wird dann fein zermahlen und der größere Teil der zurückbleibenden Hüllen durch Sieben entfernt. Das feine Mehl wird nun mit 92- bis 94%igem Alkohol koliert, bis alles darin Lösliche entfernt ist. Nachdem der Überschuß des Alkohols auf einem *Büchner*schen Trichter abgesaugt ist, wird der Rückstand auf einer feinen Schicht ausgebreitet, bis der anhaftende Alkohol verdampft ist.

Man behandelt 1 *kg* Mehl mit 5 *l* 10%iger Kochsalzlösung und mit so viel gesättigter Barytlösung, bis das Extrakt gegen Lackmus neutral reagiert. Das Ganze wird dann auf eine Anzahl große Faltenfilter (*Schleicher-Schüll* Nr. 580) gebracht und ablaufen gelassen. Nach 4 Stunden hat man ungefähr 3500 cm^3 klares Filtrat. Der Rückstand mit den Filtern wird ausgepreßt und der Preßsaft nach klar filtriert. Das Volumen des filtrierten Extraktes beträgt ungefähr 80% des angewandten Lösungsmittels.

Der klare Extrakt wird dann 4 Tage lang dialysiert, wobei fast sämtliches Globulin gefällt wird. Der Inhalt des Dialysators wird hierauf in Töpfe gegossen und stehen gelassen, bis sich beinahe alle feste Substanz abgesetzt hat. Die trübe Lösung wird nunmehr von der halbflüssigen Fällung dekantiert. Zu der dekantierten Lösung wird so lange 2%ige Salzsäure zugefügt, als hiedurch eine Fällung verursacht wird. Die Substanz, die beim Stehen sich absetzt, wird zur Hauptmenge gefügt. Das Konglutin wird gewaschen, indem man es in 1 *l* Wasser suspendiert und aufrührt, bis es eine Emulsion bildet. Beim allmählichen Zusatz von 35 cm^3 2%iger Salzsäure scheidet es sich als flockiger Niederschlag ab, der sich bald als halbflüssige Masse absetzt und die überstehende Flüssigkeit beinahe klar läßt. Die Lösung wird dekantiert und mit noch etwas mehr 2%iger Salzsäure behandelt. Wenn sich beim Stehen noch mehr Substanz abscheidet, kann diese zur Hauptportion hinzugegeben werden. Die letztere wird noch einmal mit Wasser aufgerührt und nach dem Absetzen und Dekantieren mit ungefähr 1 *l* Alkohol durchgerührt. Dann wird auf einem *Buchner*schen Trichter, der mit einer Schicht gehärteten Filtrierpapieres versehen ist, filtriert, der Rückstand mit absolutem Alkohol entwässert, noch einmal abgesaugt und an der Luft getrocknet. So zubereitet wiegt das rohe Konglutin ungefähr 200 *g* und bildet ein blaßgelbes, dichtes Pulver, das in Salzlösungen leicht und vollständig löslich ist.

Um es in Konglutin-α und Konglutin-β zu trennen, wird es in 2 *l* 1 Zehntel gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst und so viel Ammonsulfatkristalle zugefügt, bis die Lösung 55 Hundertstel völliger Sättigung erreicht. Der gefällte Niederschlag wird auf gehärtetem Filtrierpapier abfiltriert und das Filtrat auf 65 Hundertstel gesättigt. Das Filtrat dieses zweiten Niederschlages wird dann völlig mit Ammonsulfat gesättigt und die Fällung auf einem gehärteten Faltenfilter gesammelt.

Der erste Niederschlag besteht aus beinahe reinem Konglutin-α, der zweite aus Konglutin-β. Diese beiden Niederschläge werden dann, wie oben geschildert, getrennt und wiedergefällt. Nach Wiederholung des Prozesses ist die Trennung praktisch vollständig[1]). Jedes Produkt wird dann für sich in Kochsalzlösung gelöst, die Lösung, wenn nötig, filtriert und dialysiert, bis alles Konglutin gefällt ist. Die Niederschläge werden nun auf gehärtetem Filter gesammelt, mit Wasser und Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol digeriert und über Schwefelsäure getrocknet.

b) Eigenschaften des „Konglutin-α".

Elementare Zusammensetzung[2]),[3]). C 51·75; H 6·96; N 17·57; S 0·62; O 23·10%.

Löslichkeit[2]). Unlöslich in Wasser, hingegen leicht löslich in 5- bis 10%igen Natriumchloridlösungen. Konglutin zeigt weder nach Behandlung mit Alkohol noch nach dem Trocknen das Bestreben, in Salzlösungen unlöslich zu werden. In dieser Hinsicht zeigt es einen ausgesprochenen Gegensatz zu anderen Samenglobulinen. Konglutin-α ist in gesättigten Kochsalz- und Magnesiumsulfatlösungen löslich.

Hitzekoagulation[2]). Eine 5%ige Lösung von Konglutin-α in 10%iger Kochsalzlösung zeigt beim Erhitzen auf 100° keine merkliche Veränderung, ausgenommen, daß sich nach einiger Zeit auf der Oberfläche eine durchscheinende Haut bildet. Beim Kühlen gesteht die Lösung zu einer Gallerte.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammonsulfat[4]), [3]). In einer 1 Zehntel gesättigten Ammonsulfatlösung beginnt Fällung mit 4·2 cm^3. Sie

[1]) *Osborne* and *Harris*: The Precipation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins (Second Paper). Amer. Journ. of Physiol. **13.** 436 (1905).

[2]) *Osborne* and *Campbell*: The Proteine of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chem. Soc. **19.** 454 (1897).

[3]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. **13.** 436 (1905).

[4]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25.** 837 (1903).

ist praktisch vollständig mit 7 *cm*³ (*Hofmeisters* Methode), d. h. die Fällung liegt zwischen 34 und 63% wirklicher Sättigung.

Farbenreaktionen. Konglutin gibt alle gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1]) und [2]).

Stickstoffverteilung[3]). N als NH_3 2·12; basischer N 5·20; nicht basischer N 10·38; N im MgO-Niederschlag 0·18.

c) Eigenschaften des „Konglutin-β".

Elementare Zusammensetzung[4]), [5]). C 49·91; H 6·81; N 18·40; S 1·67; O 23·21%.

Löslichkeit[4]). Unlöslich in Wasser, aber leichter löslich in verdünnten Kochsalzlösungen als Konglutin-α. Es ist viel mehr Salzsäure oder Essigsäure nötig, um in Lösungen von Konglutin-β eine Fällung hervorzurufen, als es bei Konglutin-α der Fall ist. Löslich in gesättigter Natriumchlorid- oder Magnesiumsulfatlösung.

Hitzekoagulation[6]). 5% Konglutin-β, gelöst in 10%iger Kochsalzlösung, wird bei 94° trübe. Nach langem Erhitzen auf 99° wird ein gelatinöses Koagulum abgeschieden.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Fällung mit Ammoniumsulfat[7]), [8]). Da Konglutin-α und Konglutin-β nebeneinander vorkommen und da die obere Grenze der Fällbarkeit des ersteren nahe des letzteren ist, ist keine bestimmte untere Grenze für Konglutin-β festgestellt worden. Es wird meist über 7 *cm*³ nach *Hofmeisters* Bestimmungsmethode oder über 64% wirklicher Sättigung gefällt.

Stickstoffverteilung[9]). N als NH_3 2·65; basischer N 5·13; nicht basischer N 10·30; N im MgO-Niederschlag 0·14%.

---

[1]) *Abderhalden* and *Herrick*: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Konglutins aus Samen von Lupinus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **45**. 479 (1905).

[2]) *Osborne*, *Leavenworth* and *Brautlecht*: The Different Forms of Nitrogen in Proteins. Amer. Journ. of Physiol. **23**. 180 (1908).

[3]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[4]) *Osborne* and *Campbell:* The Proteine of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 454 (1897).

[5]) *Osborne* and *Harris:* The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetabile Proteins. Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. **13**. 436 (1905).

[6]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 837 (1903).

[7]) *Osborne* and *Harris*: The Precipitation Limits with Ammonium Sulphate of some Vegetable Proteins. Second Paper. Amer. Journ. of Physiol. **13**. 436 (1905).

[8]) *Osborne* and *Campbell*: The Proteine of Lupine Seeds. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 454 (1897).

[9]) *Osborne* und *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

d) Darstellung des Konglutins aus der blauen Lupine.

Die Darstellung des rohen Konglutins aus der blauen Lupine wird in derselben Weise geleitet, wie bei der gelben Lupine. Die Ausbeute bei der blauen Lupine ist etwas geringer als bei der gelben Art. Da der Verfasser bis jetzt keine Erfahrung mit der fraktionierten Fällung des Konglutins der blauen Lupine durch Ammonsulfat besitzt, so kann er keine Angaben über diesen Prozeß machen. Aus demselben Grunde gibt er keine bestimmte Feststellungen über Präparate aus anderen Lupinenvarietäten.

II. Prolamine.

1. Gliadin aus Weizen (Triticum vulgare) und Roggen (Secale cereale).

Gliadin bildet ungefähr die Hälfte der Eiweißsubstanz des Weizensamens (Triticum vulgare) und bildet, zusammen mit einer ungefähr gleichen Menge Glutenin, den größeren Teil des Glutens (Kleber), welcher durch Waschen mit Wasser aus Weizenmehl erhalten werden kann. Das Endosperm des Samens enthält das Gliadin, das daher am besten aus Weizenmehl erhalten wird, von dem die anderen Samenteile völlig entfernt sind, was durch die üblichen Prozesse bei seiner Darstellung geschieht. Die Gliadinmenge variiert stark in verschiedenen Weizensorten, aber das Verhältnis des Gliadins zu den anderen Proteinen ist beinahe dasselbe. Der Gliadingehalt ist daher dem Stickstoffgehalt des Samens nahezu proportional.

Gliadin zeichnet sich von anderen Proteinen durch seine leichte Löslichkeit in Alkohol von 70 bis 80% aus. Obgleich Gliadin in absolutem Alkohol völlig unlöslich ist und sich in Wasser nur wenig löst, löst es sich leicht in Mischungen dieser beiden Flüssigkeiten. Der Löslichkeitsgrad wechselt mit dem relativen Verhältnis von Alkohol und Wasser, er nimmt bis zu einem gewissen Maximum bei Zufügung von Wasser zum Alkohol zu und dann ab. Das optimale Verhältnis von Alkohol und Wasser wurde nie bestimmt, doch liegt es nicht weit von 70% Alkohol; über 90% oder unter 50 Volumprozent wird nur wenig Gliadin gelöst. Neutrale Salzlösungen lösen nur wenig Gliadin, aber Wasser, das freie Säuren oder Alkalien enthält, löst es leicht.

Von mehreren Forschern ist bezweifelt worden, ob Gliadin das einzige alkohollösliche Weizenprotein ist. Die meisten von ihnen, die neuerdings diese Frage studiert haben, glauben, daß nur ein solches Protein im Weizensamen vorkommt. Auch des Verfassers ausgedehnte Untersuchung dieser Frage spricht nicht für das Vorkommen eines weiteren Proteins im alkoholischen Extrakt. Die

Unterschiede der Löslichkeit in verschieden starkem Alkohol und die Unterschiede in der Zusammensetzung, die *Ritthausen* die Gegenwart von Glutenfibrin und von Muzedin vermuten ließen, sind zweifellos verursacht durch die Bildung verschiedener Gliadinsalze mit aus dem Samen extrahierten Säuren und durch Verunreinigungen der Präparate mit verschiedenen, nicht eiweißartigen Substanzen. Das hier unter dem Namen Gliadin beschriebene Protein stellt daher sämtliches mit Alkohol aus dem Weizensamen extrahierbare Protein dar.

a) Darstellung des Gliadins aus Weizenmehl.

Gliadin wird entweder dargestellt durch direkte Extraktion des Mehles mit 70%igem Alkohol oder durch Extraktion des durch Wasser aus dem Mehl gewaschenen Weizenklebers. In jedem Fall wird ein stickstoffreiches Mehl die beste Ausbeute geben.

Vier gleiche Portionen Mehl werden mit 70%igem Alkohol extrahiert, indem man den Auszug der ersten Portion zum Mehl der zweiten fügt und den Prozeß fortführt, bis das Extrakt in Berührung mit mindestens 4 Portionen frischen Mehles gewesen ist. Die extrahierten Rückstände werden auf ähnliche Weise sukzessive gewaschen, bis jeder mit den Extrakten der vorausgegangenen Extraktionen und zuletzt mit 70%igem Alkohol behandelt worden ist.

Die für jede Portion nötige Menge Alkohol beträgt ungefähr das fünffache Gewicht des Mehles und die Extraktion jeder Portion wird am besten über Nacht ausgedehnt. Auf diese Weise kann jeden Tag ein einheitliches Extraktquantum gewonnen werden, ohne daß zu viel Zeit verwendet werden muß. So kann eine starke Gliadinlösung erhalten werden, welche, vollständig klar durch eine Schicht von Papierbrei filtriert werden muß.

Der klare Auszug wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 70° konzentriert. Die Konzentration und die weitere Behandlung kann gleichzeitig mit der Extraktion vorgenommen werden. Wenn die Konzentration so weit vorgeschritten ist, daß die Lösung des Gliadins trübe wird und zu schäumen beginnt, müssen neue Portionen von Extrakt oder starkem Alkohol zugefügt werden, um das Gliadin wieder in Lösung zu bringen. Es muß während dieser Konzentration Sorge getragen werden, daß das Gliadin in Lösung bleibt und daß die Temperatur des Wasserbades nicht über 70° steigt, denn bei zu langem oder zu hohem Erhitzen mit verdünntem Alkohol koaguliert das Gliadin.

Wenn sämtliche Auszüge zu einem dicken Sirup konzentriert sind, gießt man ihn unter kontantem Umrühren in einem feinen Strom in das sechs- oder achtfache Volumen eiskalten destillierten Wassers,

dem man zur völligen Abscheidung des Gliadins einige Gramm Kochsalz zufügt. Nachdem sich das Gliadin in zusammenhängender Schicht abgeschieden hat, wird die wässerige Lösung so vollständig als möglich dekantiert, der Niederschlag zur Entfernung anhaftender Lösung oberflächlich mit Wasser gewaschen und dann durch Zugabe einer geringen Menge starken Alkohols in Lösung gebracht. Wenn das vom Gliadin zurückbehaltene Wasser nicht genügt, um Lösung zu bewirken, muß noch etwas Wasser zugefügt werden. Diese Lösung wird dann unter vermindertem Druck zu einem Sirup konzentriert und das Gliadin auf die eben beschriebene Weise durch Eingießen in Wasser noch einmal gefällt. Durch diese Behandlung werden die wasserlöslichen Kohlehydrate, Salze und andere wasserlösliche Proteine vom Gliadin getrennt.

Das Gliadin wird noch einmal in der oben beschriebenen Weise in Alkohol gelöst und die Lösung zu einem dicken Sirup konzentriert, indem man von Zeit zu Zeit Alkohol zufügt, um die Menge des Wassers auf eine Quantität zurückzuführen, die eben genügt, um das Gliadin in Lösung zu halten. Der Sirup wird dann in feinem Strom unter konstantem Rühren in das acht- bis zehnfache Volumen sehr starken Alkohols gegossen, wobei das Gliadin als zähe Masse gefällt wird, deren größter Teil in einem Klumpen am rührenden Glasstab hängt.

Das so gefällte Gliadin wird am besten unter absolutem Alkohol in kleine Stücke zerteilt und dann mit absolutem Alkohol digeriert, bis es in eine leicht zerreibliche Masse übergeführt ist. Der Alkohol wird dann durch schnelles Filtrieren unter Vermeidung von Luftfeuchtigkeit entfernt und das Gliadin mit trockenem Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Beim Trocknen in gewöhnlicher Zimmerluft nimmt das mit absolutem Alkohol imprägnierte Gliadin Feuchtigkeit auf und wird zähe, so daß schließlich eine hornartige Masse resultiert, die nicht leicht zerrieben werden kann. Wenn jedoch das Gliadin in der beschriebenen Weise vom Alkohol befreit wird, kann es nach dem Trocknen leicht zu einem feinen Pulver zerrieben werden.

b) Darstellung des Gliadins aus Weizengluten.

Um das Gliadin aus Weizenklebern darzustellen, wird das Mehl mit so viel Wasser gemischt, daß es einen zusammenhängenden Teig bildet und in einem langsamen Strom von Wasser so lange gewaschen, bis die Stärke fast völlig entfernt ist. Das zurückbleibende Gluten wird, noch feucht, in möglichst kleine Stücke zerteilt. Um aus großen Quantitäten von Gluten verhältnismäßig kleine Stücke zu erhalten, ist es am besten, das Gluten durch die Fruchtpresse durchzupressen. Das zerteilte Gluten wird dann gewogen und sein Wassergehalt als 2 Drittel des Gesamtgewichtes des feuchten

Glutens bestimmt. 200 cm^3 92%igen Alkohols werden für je 100% anwesenden Wassers zugefügt und das Gluten unter häufigem Umrühren während 24 Stunden digeriert. Besser ist es, wenn man die ungelöste Masse mit der Hand durcharbeitet und durchknetet.

Das Gluten wird dann auf ein Tuch abgegossen und durch Druck so weit wie möglich von der anhaftenden Lösung befreit. Es wird dann wieder so lange mit 70%igem Alkohol extrahiert, als eine genügende Menge Gliadin in Lösung geht. Das so erhaltene Extrakt wird völlig klar filtriert und in gleicher Weise, wie bei der direkten Extraktion des Mehles, mit Alkohol behandelt. Da die wasserlöslichen Bestandteile des Mehles beinahe vollständig durch Auswaschen des Glutens entfernt sind, genügt eine einmalige Fällung des Gliadins durch Ausgießen seiner konzentrierten alkoholischen Lösung in ein großes Volumen Wasser, um die geringe Menge wasserlöslicher Bestandteile, die der Auszug enthalten kann, zu entfernen.

c) Darstellung des Gliadins aus Roggen.

Das alkohollösliche Protein des Roggens ist dem des Weizens so ähnlich, daß bis jetzt keine genügenden Unterschiede entdeckt werden konnten, die eine Unterscheidung der beiden Proteine rechtfertigen würden. Ihre Identität ist jedoch auch noch nicht erwiesen. Da Roggenmehl kein zusammenhaftendes Gluten bildet, ist es notwendig, das Gliadin aus diesem Samen durch direkte Extraktion zu gewinnen. Das Gliadin ist daher aus Roggenmehl in derselben Weise dargestellt worden, wie es für die direkte Extraktion aus Weizenmehl beschrieben wurde.

d) Eigenschaften des Gliadins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·72; H 6·86; N 17·66; S 1·03; O 21·73%.

Löslichkeit[1]). Das nach der beschriebenen Methode dargestellte Gliadin ist gewöhnlich nur in geringem Maße wasserlöslich, in Wasser, das anorganische Salze enthält, ist es noch weniger löslich. In absolutem Alkohol ist es gänzlich unlöslich, aber in Mischungen von Alkohol und Wasser ist es bis zu dem Verhältnis von zirka 70volumprozentigem Alkohol und 30% Wasser zunehmend löslich. In verdünnten Lösungen von Ätzalkalien ist Gliadin leicht löslich und fällt aus solchen Lösungen durch Kohlensäure oder Natriumbikarbonat. Gliadin ist auch in verdünnten Säuren löslich. In Äther, Chloroform, Benzin und beinahe allen wasserfreien Lösungsmitteln ist es ganz unlöslich.

[1]) *Osborne* and *Voorhees*: The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chem. Journ. **15**. 392 (1893).



Hitzekoagulation[1]). Gliadin wird auch durch lange dauerndes Sieden seiner Lösung in 70%igem Alkohol nicht verändert. In Wasser oder in sehr verdünntem Alkohol wird es durch Sieden koaguliert.

Spezifische Drehung[2]). Gelöst in 80volumprozentigem Alkohol ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -92{\cdot}3^0$.

Farbenreaktionen: Gliadin gibt sämtliche gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [3]), [4]) und [5]).

Stickstoffverteilung[6]) und [7]). N als NH_3 4·33; basischer N 0·98; nicht basischer N 12·21; N im MgO-Niederschlag 0·14%.

Zur Bestimmung des Gliadingehaltes verfährt man nach *Hoagland*[8]) (vgl. auch *Olson*[9]) folgendermaßen:

2 *g* der zu untersuchenden Probe des Mehles werden 60 bis 90 Minuten auf einer Schüttelmaschine mit 100 cm^3 50%igem Alkohol geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wird abfiltriert und in einem bestimmten Teil der Lösung der N nach *Kjeldahl* bestimmt.

2. Hordein aus Gerste (Hordeum vulgare).

Hordein macht 3 bis 4% des Mehles aus. Neben Hordein enthält dieser Same, wie der des Weizens, eine kleine Menge Albumin, Globulin und Proteose, die zusammen etwa 1% des Samens bilden. Neben diesen Proteinen enthält das Gerstenmehl wahrscheinlich noch andere Eiweißstoffe, denn nach der Extraktion obiger Proteine

---

[1]) *Osborne* and *Voorhees:* The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chem. Journ. **15**. 392 (1893).

[2]) *Osborne* and *Harris* : The Specific Rotation of Some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[3]) *Abderhalden* und *Samuely* : Die Zusammensetzung des „Gliadins" aus Weizenmehl. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **44**. 276 (1905).

[4]) *Kossel* und *Kutscher*: Ibid. **31**. 165 (1900).

[5]) *Osborne* and *Clapp* : The Chemistry of the Protein Bodies of the Wheat Kernel. Part III. Amer. Journ. of Physiol. **17**. 231 (1906).

[6]) *Osborne* und *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[7]) *Osborne, van Slyke, Leavenworth* und *Vinograd*: Einige Produkte der Hydrolyse des Gliadins usw. Journ. of Biolog. Chem. **22**. 259 (1915).

[8]) *R. Hoagland*: Die Bestimmung von Gliadin oder alkohollöslichem Protein in Weizenmehl. Journ. of Indust. and Engin. Chem. **3**. 838 (1911).

[9]) *G. A. Olson*: Die quantitative Bestimmung der kochsalzlöslichen Proteine in Weizenmehl. Journ. of Indust. and Engin. Chem. **5**. 917 (1913) und **6**. 211 (1914). Ferner vgl. auch *C. H. Bailey* und *M. J. Blish:* Über die Identität der aus dem Weizenmehl durch die gebräuchlichen Lösungsmittel extrahierten Proteine. Journ. of Biolog. Chem. **23**. 345 (1915).

bleibt noch im ungelösten Rückstand des Mehles eine beträchtliche Quantität Stickstoff, von dem ein Teil durch verdünntes Alkali extrahiert und durch verdünnte Säuren gefällt werden kann.

Da das Gerstenmehl viel Gummi enthält, der in verdünnten, alkalischen Lösungen auch löslich ist, gelang es bis jetzt nicht, Präparate dieses in neutralen Lösungen unlöslichen Proteins zu erhalten, die für weiteres Studium geeignet wären. Es ist daher nichts Bestimmtes über das Restprotein dieses Samens bekannt. Es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, daß diese unbekannte Proteinsubstanz dem Weizenglutenin ähnlich ist.

a) Darstellung des Hordeins.

Die Gewinnung des Hordeins erfolgt in genau derselben Weise, wie die Darstellung des mit 70%igem Alkohol aus dem Weizenmehl extrahierten Gliadins (siehe S. 438).

b) Eigenschaften des Hordeins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 54·29; H 6·80; N 17·21; S 0·83; O 20·87%.

Löslichkeit[1]). Das nach der eben beschriebenen Methode dargestellte Hordein ist in Wasser wenig löslich und gibt Lösungen, die durch Zusatz von Kochsalz gefällt werden. Die gelöste Menge ist sehr klein und die Löslichkeit in Wasser scheint etwas geringer zu sein als die des Gliadins. In verdünntem Alkohol verschiedener Konzentration löst sich Hordein in ungefähr gleichem Maße wie Gliadin. In sehr verdünnten Lösungen von Säuren oder Ätzalkalien ist das Hordein leicht löslich und wird durch Neutralisation gefällt, ohne seine Löslichkeit in Alkohol zu verlieren.

Hitzekoagulation[1]). Hordein wird durch Kochen der 70%igen alkoholischen Lösung nicht verändert, beim Erhitzen mit Wasser oder mit verdünntem Alkohol wird es koaguliert.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Farbenreaktionen. Hordein gibt alle gewöhnlichen Reaktionen der Proteine, möglicherweise mit Ausnahme von *Molischs* Reaktion. Da Hordein mit Schwefelsäure allein eine starke rote Färbung gibt, die beim Zufügen von α-Naphthol anscheinend nicht geändert wird, ist es schwierig zu entscheiden, ob es die *Molisch*-Reaktion gibt oder nicht.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [2]) und [3]).

---

[1]) *Osborne*: The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chem. Soc. **17**. 539 (1895).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of Hordein. Amer. Journ. of Physiol. **19**. 117 (1907).

[3]) *Kleinschmitt*: Hydrolyse des Hordeins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **54**. 276 (1907).

Stickstoffverteilung[1]). N als NH_3 4·01; basischer N 0·77; nicht basischer N 12·04; N im Mg O-Niederschlag 0·23.

3. Zein aus Mais (Zea Mays).

Zein ist das hauptsächliche Protein der Maissamen, von denen es ungefähr 5% ausmacht. Es ist charakterisiert durch seine bedeutende Löslichkeit in verhältnismäßig starkem Alkohol, obgleich es in absolutem Alkohol oder in Wasser völlig unlöslich ist. Aus verdünntem Alkohol wird Zein gefällt, wenn das Verhältnis von Wasser zu Alkohol in der Lösung einen bestimmten Wert erreicht hat.

In alkoholischer Lösung erleidet das Zein eine langsame Umwandlung, indem konzentrierte Lösungen, die zuerst ganz flüssig waren, nach einigen Tagen durchsichtige Gallerten bilden, die bei längerem Stehen härter werden. Nachdem diese Umwandlung vor sich gegangen ist, kann das Zein nicht wieder in Alkohol gelöst werden, und es ist wichtig, alkoholische Lösungen von Zein nicht mehrere Tage stehen zu lassen, da bei nur geringfügigem Auftreten dieser Umwandlung es praktisch unmöglich ist, die Lösung zu filtrieren.

a) Darstellung des Zeins.

Zein wird am besten aus fein gemahlenem weißen Mais dargestellt, denn der Farbstoff der gelben Varietäten, der in Alkohol leicht löslich ist, kann aus den Präparaten nicht völlig entfernt werden. Zein wird auch in großen Quantitäten aus dem stickstoffhaltigen Nebenprodukt der Maisstärkefabrikation erhalten, denn das sogenannte „Gluten“ enthält eine große Menge dieses Proteins. Die beste Ausbeute wird aus dem „Gluten“ erhalten, wenn es noch feucht ist oder aus dem bei niedriger Temperatur getrockneten. Der fein zermahlene Samen oder das „Gluten“ wird mit 80 bis 90%igem Alkohol in der beim Gliadin (S. 438) beschriebenen Weise extrahiert. Das filtrierte Extrakt wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen gebracht, wobei man durch Zufügen von starkem Alkohol Sorge trägt, daß keine Koagulation erfolgt. Die konzentrierte Lösung wird dann in das acht- bis zehnfache Volumen Wasser, das etwas Natriumchlorid enthält, gegossen, und das Zein als flockiger Niederschlag, der sich bald zu einer dichten zusammenhängenden Masse vereinigt, ausgefällt.

Nach dem Dekantieren der Lösung wird das Zein in kleine Stücke zerteilt und durch Schütteln mit 90 bis 95%igem Alkohol in einer verschlossenen Flasche aufgelöst. Die konzentrierte Lösung wird dann, solange als Fett entfernt wird, in einem Scheidetrichter

---

[1]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).



mit Petroläther geschüttelt und darauf, wenn nötig, vollständig klar filtriert und das Zein durch Eingießen in ein Gemisch von 2 Volumen Alkohol und 1 Volumen Äther gefällt. Wenn sich das Zein nicht aus dem Alkoholäthergemisch ausscheidet, muß eine ganz geringe Menge in Alkohol gelöstes Ammonazetat zugefügt werden. Da rohes Zein eine verhältnismäßig große Menge Fett und in Äther lösliche Substanzen enthält, ist für deren Entfernung eine gründliche Behandlung seiner Lösung mit Petroläther und Fällen mit Ätheralkohol notwendig. Auf diese Weise werden Fette und Farbstoffe leichter und vollständiger entfernt als durch Extraktion des isolierten Zeins mit Äther. Um daher von ätherlöslichen Substanzen vollständig freie Lösungen zu erzielen, ist es wichtig, die Fällung mit Ätheralkohol so lange zu wiederholen, bis die Lösung keine ätherlöslichen Substanzen mehr enthält.

Wenn das Zein von Fett befreit ist, wird es in einer kleinen Menge starken Alkohols gelöst, und diese Lösung in einem feinen Strom in ein großes Volumen destillierten Wassers, das geringe Mengen Natriumchlorid enthält, gegossen. Das gefällte Zein wird dann mit der Hand, in kleine Stücke zerteilt, auf einer passenden Fläche ausgebreitet und an der Luft trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wird das Produkt gemahlen und in einer Flasche bis zum Gebrauch verschlossen aufbewahrt.

Auf diese Weise aus weißem Mais dargestellt, bildet das Zein eine schneeweiße Substanz, die ohne große Schwierigkeit zu einem Pulver zerrieben werden kann. Aus gelbem Mais bereitet, zeigt das Produkt eine gelbe Färbung.

b) Eigenschaften des Zeins.

Elementare Zusammensetzung[1]). C 53·23; H 7·26; N 16·13; S 0·60; O 20·78%.

Löslichkeit[2]). Zein ist in Wasser und in absolutem Alkohol unlöslich. In käuflichem Alkohol von 90 bis 92% ist es leicht löslich und solche Lösungen können zu einem Sirup konzentriert und selbst zur Trockne verdampft werden, ohne daß sich Zein aus der Lösung abscheidet. Das Zein, das beim Eindampfen dieser Lösungen zurückbleibt, bildet einen durchsichtigen Film von beträchtlicher Zähigkeit und Biegsamkeit. Verdünnterer Alkohol löst Zein in gleicher Weise, aber bei der Konzentration solcher Lösungen scheidet sich das Zein als eine opake plastische Masse ab. Alkohol von weniger als 50% löst nur wenig Zein. In 0·2%iger Kalihydrat-

[1]) *Chittenden* and *Osborne*: A Study of the Proteids of the Corn or Maize Kernel. Amer. Chem. Journ. **13**. 453, 529 (1891) und **14**. 20 (1892).

[2]) *Osborne*: The Amount and Properties of the Proteids of the Maize Kernel. Journ. Amer. Chem. Soc. **19**. 525 (1897).

lösung ist Zein leicht löslich und wird durch Neutralisation unverändert wieder gefällt. In 0·5%iger Natriumkarbonatlösung oder 0·2%iger Salzsäure ist Zein selbst beim Erwärmen auf 40° unlöslich.

Hitzekoagulation. Durch fortgesetztes Sieden mit Wasser oder sehr verdünntem Alkohol wird Zein allmählich koaguliert und in Alkohol unlöslich.

Spezifische Drehung[1]). In 90%igem Alkohol ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -28^0$.

Farbenreaktionen. Zein gibt die üblichen Farbenreaktionen der Proteine, ausgenommen die *Molisch*-Reaktion und die Reaktion für Tryptophan.

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [2]).

Stickstoffverteilung[3]). N als NH_3 2·97; basischer N 0·49; nicht basischer N 12·51; N im MgO-Niederschlag 0·16%.

III. Gluteline.

Glutenin aus Weizen (Triticum vulgare).

Glutenin macht ungefähr die Hälfte der Eiweißsubstanz des Weizens aus und bildet zusammen mit dem Gliadin beinahe das ganze durch Auswaschen des Weizenmehles mit Wasser erhaltene Gluten. Glutenin kommt im Endosperm der Samen vor und kann daher aus dem käuflichen Weizenmehl erhalten werden. Wie beim Gliadin variiert die Menge des Glutenins stark bei den verschiedenen Weizenvarietäten und ist am größten in den stickstoffreichsten.

Glutenin ist das in Wasser, Salzlösungen und Alkohol unlösliche Weizenprotein. Es kann nur in verdünnten, kaustischen Alkalien oder Säuren gelöst werden.

Obgleich Glutenin und Gliadin dieselbe elementare Zusammensetzung haben, sind sie doch deutlich verschiedene Proteine, wie das Resultat der totalen Hydrolyse beider Eiweißarten deutlich zeigt.

a) Darstellung des Glutenins.

Glutenin wird am besten aus Gluten dargestellt, so daß der Glutenrückstand, der nach der Alkoholextraktion des Gliadins hinterbleibt, für diesen Zweck gebraucht werden kann (S. 438).

[1]) *Osborne* and *Harris*: The Specific Rotation of some Vegetable Proteins. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 842 (1903).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Hydrolysis of the Proteins of Maize. Amer. Journ. of Physiol. **20**. 477 (1908).

[3]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

Nach der Extraktion des fein zerteilten Glutens mit Alkohol bis zur völligen Entfernung sämtlichen Gliadins wird der ungelöste Rückstand bei Zimmertemperatur getrocknet und möglichst fein gemahlen. Das resultierende Pulver wird mit Alkohol und Äther so lange extrahiert, als etwas gelöst wird. Der Alkohol wird dann bei Zimmertemperatur verdampft und das zurückbleibende Pulver mit so viel 0·2%iger Kalihydroxydlösung behandelt, als zur Lösung nötig ist. Die erhaltene trübe Lösung wird dann auf einem Breifilter filtriert und, wenn die Lösung vollständig klar ist, mit sehr verdünnter Salzsäure neutralisiert. Der Niederschlag wird dann mit 70%igem Alkohol so lange als Gliadin in Lösung geht extrahiert. Dann wird nochmals in einer möglichst geringen Menge 0·2%iger Kalihydroxydlösung gelöst, die Lösung, wenn nötig, klar filtriert und noch einmal mit sehr verdünnter Salzsäure gefällt. Nachdem man, um sich von der vollständigen Wegnahme sämtlichen Gliadins zu überzeugen, wieder mit 70%igem Alkohol extrahiert hat, wird das Glutenin vollständig mit absolutem Alkohol entwässert, mit Äther extrahiert und über Schwefelsäure getrocknet. Wenn die alkalische Lösung, aus der das Glutenin gefällt wird, nicht völlig klar ist, so ist das erhaltene Produkt nicht rein und enthält weniger Stickstoff und mehr Kohlenstoff als in völlig gereinigten Gluteninpräparaten gefunden wird.

Das so gewonnene Glutenin ist ein weißes, voluminöses Pulver.

b) *Eigenschaften des Glutenins.*

Elementare Zusammensetzung[1]). C 52·34; H 6·83; N 17·49; S 1·08; O 22·26%.

Löslichkeit[1]). Glutenin ist in kaltem Wasser oder in kaltem verdünnten Alkohol praktisch unlöslich. Bei der Behandlung mit warmem Wasser oder mit warmem Alkohol löst sich jedoch eine sehr geringe Menge, die sich beim Abkühlen wieder abscheidet. In sehr verdünnten Lösungen von kaustischen Alkalien oder Säuren ist Glutenin leicht löslich und wird bei Neutralisation bis zur ganz schwachen, sauren Reaktion mit unveränderten Eigenschaften wieder gefällt.

Hitzekoagulation. In siedendem Wasser koaguliert Glutenin und wird in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien unlöslich.

Spezifische Drehung. Sie wurde nicht bestimmt.

Farbenreaktionen. Glutenin gibt sämtliche bekannten Farbenreaktionen der Proteine.

---

[1]) *Osborne* and *Voorhees*: The Proteids of the Wheat Kernel. Amer. Chem. Journ. **15**. 392 (1893).

Gehalt an Aminosäuren: vgl. [1]), [2]) und [3]).

Stickstoffverteilung[4]). N als NH_3 3·30; basischer N 2·05; nicht basischer N 11·95; N im Mg O-Niederschlag 0·19 %.

IV. Albumine.

1. Leukosin aus Gerste (Hordeum vulgare), Roggen (Secale cereale), Weizen (Triticum vulgare).

Im Gersten-, Roggen- und Weizensamen sind ungefähr 0·4 % Albumin, Leukosin vorhanden. Die elementare Zusammensetzung und die Eigenschaften des Leukosins von jedem dieser Samen sind dieselben[5]). Das aus diesen Samen erhaltene einzige andere wasserlösliche Protein ist eine sehr geringe Menge von Proteose, von der das Leukosin getrennt wird, indem man den Auszug bei zirka 65° koaguliert.

Da Leukosin einen so geringen Teil der ganzen Körner bildet, ist es kaum empfehlenswert, große Quantitäten direkt aus den Samen darzustellen. Da aber der ölfreie Embryo des Weizens ungefähr 10 % Leukosin enthält, so lassen sich verhältnismäßig große Mengen schnell aus den käuflichen „Weizenkeimen", die bei der Darstellung des Weizenmehles gewonnen werden, gewinnen. Dieses aus Mühlen zu erhaltende Produkt besteht zum größten Teil aus dem Embryo, enthält aber auch ein wenig Endosperm und Kleie. Da diese Embryonen zwischen Rollen in dünne Schuppen verwandelt worden sind, ist es nicht nötig, feiner zu mahlen, um eine gute Ausbeute an Leukosin zu erhalten. Auch ist die Entfernung des Öles nicht erforderlich.

Der Weizenembryo enthält auch eine große Menge von Nukleinsäure, die sich bei der Extraktion mit Wasser teilweise zusammen mit dem Leukosin löst. Wenn der wässerige Auszug des Embryos sofort durch Erhitzen koaguliert wird, scheidet sich eine beträchtliche Menge Nukleinsäure im Verein mit dem koagulierten Leukosin ab. Wenn jedoch das Leukosin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat zuerst gefällt und der Niederschlag ungelöst wird, bleibt die

---

[1]) *Osborne* and *Clapp*: The Chemistry of the Protein Podies of the Wheat Kernel. Amer. Journ. of Physiol. **17**. 231 (1906).

[2]) *Abderhalden* und *Malengreau*: Die Monoaminosäuren des Glutens. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **48**. 514 (1906).

[3]) *Kossel* und *Kutscher*: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Ibid. **31**. 165 (1900).

[4]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[5]) cf. *Osborne*: The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chem. Soc. **17**. 539 (1895).

Nukleinsäure mit einem Teil des Leukosins im unlöslichen Rückstand und das Hitzekoagulum, das nachher aus den filtrierten Lösungen erhalten wird, ist entweder ganz oder beinahe phosphorfrei.

Nach des Verfassers Ansicht wird die auf diese Weise aus dem Embryo gelöste Nukleinsäure als Proteinsalz gelöst, eine organische Bindung zwischen Nukleinsäure und Protein existiert nicht im wässerigen Extrakt[1]).

a) Darstellung von koaguliertem Leukosin.

1 Gewichtsteil Embryomehl wird mit 4 Gewichtsteilen Wasser behandelt, indem man durch Umrühren das Wasser mit dem Mehl in innige Berührung bringt. Das Ganze wird ungefähr eine Stunde stehen gelassen, so daß sich das unlösliche Material absetzen und zusammenballen kann.

Das Extrakt wird dann durch ein feinmaschiges Tuch filtriert. Dies geschieht, indem man das Tuch über ein grobes Sieb legt, das man auf ein passendes Gefäß setzt, um die durchgehende Flüssigkeit zu sammeln. Nachdem viel Lösung durchgelaufen ist, wird ein Teil der rückständigen Lösung abgeschieden, indem man das Tuch sachte derart vom Sieb nimmt, daß der Rückstand vor und rückwärts über die Oberfläche gleitet und zuletzt so weit von der Lösung befreit wird, daß er in der Presse ausgedrückt werden kann.

Da der so erhaltene trübe Auszug schleimig ist und nicht leicht filtriert werden kann, werden so viele Ammonsulfatkristalle zugegeben, bis das Extrakt halbgesättigt und das gelöste Leukosin zusammen mit den im Extrakt suspendierten unlöslichen Stoffen gefällt wird. Dieser Niederschlag wird dann auf gehärteten Faltenfiltern filtriert, mit einer reichlichen Menge Wasser behandelt und die Lösung in der unter C. 3 beschriebenen Weise völlig klar filtriert.

Der klare Auszug wird dann in einem Wasserbad auf 65° erhitzt, bis sich das koagulierte Leukosin in großen Flocken aus der klar zurückbleibenden Lösung abscheidet. Das Koagulum wird auf Faltenfilter abfiltriert, tüchtig mit heißem Wasser gewaschen, mit absolutem Alkohol wasserfrei gemacht und mit trockenem Äther extrahiert. Das auf diese Weise gewonnene koagulierte Leukosin bildet ein leichtes farbloses Pulver.

b) Eigenschaften des koagulierten Leukosins.

Elementare Zusammensetzung[2]). C 53·0; H 6·8; N 16·8; S 1·3; O 22·1%.

---

[1]) cf. *Osborne* and *Campbell*: The Nucleic Acid of the Embryo of Wheat and its Proteid Campounds. Juorn. Amer. Chem. Soc. **22**. 379 (1900).

[1]) *Osborne*: The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chem. Soc. **17**. 539 (1895).

L ö s l i c h k e i t[1]). Das koagulierte Leukosin ist unlöslich in Wasser und in genügend verdünnten Säuren und Alkalien. Das unkoagulierte Leukosin ist löslich in Wasser und in sauren oder alkalischen Lösungen. Die wässerige Lösung wird jedoch durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat gefällt.

H i t z e k o a g u l a t i o n[1]). Leukosin scheidet sich aus seinen wässerigen Lösungen beim langsamen Erhitzen auf 52° als flockiger Niederschlag ab, bei rascherem Erhitzen erfolgt die Abscheidung bei höherer Temperatur. Vollständige Koagulation wird nur schwierig bewirkt. Um eine praktisch vollständige Abscheidung herbeizuführen, ist längeres Erhitzen auf 65° nötig. Zusatz von Kochsalz fördert die Abscheidung des Koagulums. Wird das wässerige Extrakt während einiger Zeit auf 65° erhitzt, vom koagulierten Leukosin filtriert und auf 75° erhitzt, so wird eine sehr kleine Menge Koagulum erhalten. Dieses ist vielleicht ein anderes Albumin, doch kann es auch der Rest des bei der niedrigen Temperatur nicht koagulierten Leukosins sein.

F ä l l u n g m i t A m m o n s u l f a t. Unkoaguliertes Leukosin wird bei halber Sättigung mit diesem Salz gefällt, d. h. durch Lösen von 38 *g* Ammonsulfat in 100 cm^3 der Lösung.

F a r b e n r e a k t i o n e n. Leukosin gibt sämtliche Farbenreaktionen der Proteine.

G e h a l t a n A m i n o s ä u r e n: vgl. [2]).

S t i c k s t o f f v e r t e i l u n g[3]). N als NH_3 1·16; N als basischer N 3·50; nicht basischer N 11·83; N im MgO-Niederschlag 0·43%.

2. R i z i n a u s d e r R i z i n u s b o h n e (R i c i n u s c o m m u n i s).

Es war schon lange bekannt, daß die Samen der Rizinusölpflanze (Ricinus communis) eine sehr giftige Substanz enthalten, die zusammen mit den Proteinsubstanzen extrahiert und abgeschieden werden kann. Die gewöhnlichen Präparate vom sogenannten Rizin bestehen aus einer Mischung verschiedener Proteine zusammen mit mehr oder weniger von der toxischen Substanz. Eine sorgfältige und weitgehende Fraktionierung der Rizinusproteine hat gezeigt[4]), daß der größere Teil des Proteins dieses Samens keine toxische Wirkung hat und daher sorgfältig entfernt werden sollte

[1]) *Osborne*: The Proteids of Barley. Journ. Amer. Chem. Soc. **17**. 539 (1895).

[2]) *Osborne* and *Clapp*: Chemistry of the Protein Bodies of the Wheat Kernel. Part III. Amer. Journ. of Physiol. **17**. 231 (1906).

[3]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[4]) *Osborne, Mendel* and *Harris*: A Study of the Proteins of the Castorbean with Especial Reference to the Isolation of Ricin. Amer. Journ. of Paysiol. **14**. 259 (1905).

bei der Darstellung von Rizinpräparaten hoher Giftigkeit. Die Proteine der Rizinusbohne bestehen aus einem Globulin, das durch Dialyse leicht gefällt wird, aus einem oder mehreren Albuminen, die unter 80° koagulierbar sind, und aus einer verhältnismäßig großen Menge Proteosen.

Die dem Rizin eigentümlichen toxischen Eigenschaften finden sich nur in den Proteinpräparaten der Rizinusbohne, welche das Albumin enthalten, und es ist sehr wahrscheinlich, daß die Toxizität eine Eigenschaft des Albumins ist, obgleich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß die toxischen Eigenschaften einer nicht eiweißartigen Substanz zukommen, die unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen mit dem Albumin verbunden ist oder gefällt wird. Die enorme Giftigkeit der so dargestellten Rizinpräparate und die Bedingungen, unter denen sie erhalten werden, machen jedoch diese letztere Annahme unwahrscheinlich.

Die Rizinpräparate bestehen aus einer Mischung von ungefähr 70% koagulierbarem Albumin und 30% Proteose. Ob die letztere ein wesentlicher Bestandteil oder eine Beimischung ist, bedarf weiterer Untersuchung. Die Rizinpräparate zeigen alle charakteristischen Eigenschaften wahrer Proteinsubstanzen.

a) Darstellung des Rizins.

Die Samen von Ricinus communis var. zanzibarensis, eine kultivierte Varietät von stattlicher Größe, werden zertrümmert und vom größten Teil des Öles in einer Fruchtpresse befreit und der Rest des Öles mit Äther extrahiert. Es ist nicht nötig, die Samenschalen zu entfernen.

Nach feinem Zermahlen des ölfreien Mehles wird 1 *kg* mit 4600 cm^3 10%iger Kochsalzlösung extrahiert und der Auszug durch Filterbrei völlig klar filtriert und 4 Tage in fließendem Wasser dialysiert. Das gefällte Globulin wird auf gehärteten Faltenfiltern abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat und die Waschwasser werden auf 11.500 cm^3 gebracht. Darin werden 5050 *g* Ammonsulfat gelöst, was annähernd 45% völliger Sättigung mit diesem Salz entspricht.

Der Niederschlag wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in einem *Buchner*schen Trichter so trocken als möglich gesogen, dann in 1 *l* Wasser gelöst und 500 cm^3 einer gesättigten Ammonsulfatlösung zugefügt. Der resultierende Niederschlag wird auf einem gehärteten Faltenfilter abfiltriert und in 250 cm^3 Wasser gelöst. Seine Lösungen werden hierauf 11 Tage lang dialysiert.

Der Niederschlag, der sich bei der Dialyse bildet, wird abfiltriert und das Filtrat in einer niederen Schale mit flachem Boden in einem trockenen Luftstrom von nicht über 50° verdunstet. Das

Filtrat des vorhin erwähnten Niederschlages mit Ammonsulfatlösung wird mit 500 cm^3 gesättigter Ammonsulfatlösung weiter behandelt und der gebildete Niederschlag in Wasser 11 Tage dialysiert. Nach dem Abfiltrieren von dem durch die Dialyse gebildeten Niederschlag wird dieses Filtrat auch bei 50° in einer flachen Schale verdunstet.

Die beiden Rückstände in den Schalen werden dann entfernt, indem man so viel Petroläther darüber gießt, daß sie völlig bedeckt sind und sie dann mit einem Spatel abkratzt. Der Petroläther wird zugefügt, um das äußerst giftige Rizin beim Abkratzen am Herumspritzen zu verhindern. Dies kann man weiterhin verhüten, indem man gleichzeitig während des Abkratzens eine Glasscheibe über die Schale legt. Diese Operation muß im Freien ausgeführt werden, damit jede Möglichkeit des Verlustes von Partikeln im Laboratorium vermieden wird. Mit Hinsicht auf die große Giftigkeit des Rizins sind äußerste Vorsichtsmaßregeln gegen jede zufällige Vergiftung mit der Substanz zu treffen.

Wenn die Rückstände von den Schalen abgekratzt sind, werden sie mit Hilfe des Petroläthers in weithalsige Flaschen gegossen und der Petroläther bei niedriger Temperatur abgedunstet. Der Rückstand der ersten Schale wiegt ungefähr 12 *g*, der der zweiten ungefähr 20 *g* oder nahezu 2·5% des Samens.

b) Eigenschaften des Rizins[1]).

Elementare Zusammensetzung. Das giftigste bis jetzt erhaltene Rizinpräparat hatte folgende Zusammensetzung: C 52·01; H 7·02; N 16·56; S 1·29; P 0·00; O 23·12%.

Löslichkeit. Völlig löslich in reinem Wasser. Fällt durch Sättigung mit Magnesiumsulfat. Fällt mit Alkohol und wird hiedurch in Wasser mehr oder weniger in einem von der Konzentration und der Einwirkungszeit des Alkohols abhängigen Grade unlöslich.

Hitzekoagulation. Die Koagulationstemperatur hängt zum großen Teil von der Konzentration der Lösung und der Gegenwart von Salzen ab. Wässerige Lösungen geben bei langsamem Erhitzen bei 60 bis 70° ein flockiges Koagulum. Das am meisten aktive Rizinpräparat ergab zirka 70% Koagulum und 30% Proteose. Die Giftigkeit der Rizinpräparate ist proportional ihrem Gehalte an koagulablem Albumin. Albuminfreie giftige Proteinfraktionen sind aus den Rizinussamen nicht erhalten worden.

Spezifische Drehung. In wässeriger Lösung ist $(\alpha)\frac{20^0}{D} = -28{\cdot}85^0$.

[1]) *Osborne*, *Mendel* and *Harris*: A Study of the Proteins of the Castorbean with Especial Reference to the Isolation of Ricin. Amer. Journ. of Physiol. **14**. 259 (1905).

Fällung mit Ammoniumsulfat. Fällt zwischen 1 Fünftel- und 2 Drittel-Sättigung mit diesem Salz.

Farbenreaktionen. Rizin gibt alle gewöhnlichen Farbenreaktionen der Proteine.

Stickstoffverteilung. N als NH_3 1·74; basischer N 4·29; nicht basischer N 10·42%.

3. Legumelin aus Erbse (Pisum sativum), Linse (Ervum lens), Saubohne (Vicia faba), Wicke (Vicia sativa), Kuherbse (Vigna sinensis), Soyabohne (Glicine hispida).

Die Samen vieler Leguminosen enthalten eine nicht unbeträchtliche Menge Albumin. Die von verschiedenen Spezies erhaltenen Präparate haben dieselbe elementare Zusammensetzung und Koagulationstemperatur. Dieses Protein ist vorläufig Legumelin genannt worden. Es ist nicht entschieden worden, ob Legumelin von verschiedenen Samen dieselbe Substanz ist. Es wurde weder bei Phaseolus noch bei Lupinus gefunden.

a) Darstellung von koaguliertem Legumelin.

Legumelin wird aus dem Kochsalzextrakt der Erbse, Linse, Saubohne, Wicke, Soyabohne und Kuherbse erhalten, nachdem diese durch andauernde Dialyse vollständig vom Globulin befreit worden sind. Die Methode für die Darstellung dieser Extrakte findet sich unter Legumin S. 417 ff; Glyzinin S. 428; Vignin S. 431.

Der vom Globulin befreite Auszug wird während einer Stunde in einem Wasserbad auf 80° erwärmt. Das sich abscheidende Koagulum wird auf einem gehärteten Faltenfilter filtriert, vom Filter genommen und durch fein verteilte Suspension in heißem Wasser vollständig gewaschen, dann durch Suspension in einer großen Menge absoluten Alkohols entwässert. Nach dem Abfiltrieren des partiell entwässerten Legumelins wird es durch wiederholtes Reiben unter absolutem Alkohol zu einem Pulver zerrieben. Wenn es so von Wasser befreit ist, wird es über Schwefelsäure getrocknet.

Es bildet, so dargestellt, ein voluminöses, schneeweißes Pulver. Wenn es durch absoluten Alkohol nicht gut entwässert worden war, entsteht beim Trocknen eine zähe, hornartige Masse, die sehr schwierig zu zerreiben ist.

b) Eigenschaften des koagulierten Legumelins.

Elementare Zusammensetzung. C 53·3; H 6·9; N 16·2; S 1·1; O 22·5%.

Löslichkeit. Das durch Hitze koagulierte Legumelin ist im wasserhaltigen Zustand in verdünnten, kaustisch alkalischen

Lösungen löslich, aber in sehr verdünnten Säuren unlöslich. Das nicht koagulierte Legumelin ist in reinem Wasser löslich, wird aber aus der wässerigen Lösung durch Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure mit viel Kochsalz gefällt. Durch Sättigung mit Kochsalz allein oder mit Magnesiumsulfat wird es nicht gefällt.

Hitzekoagulation. Die Koagulationstemperatur hängt sehr von der Konzentration der Lösung und von der Menge des vorhandenen Salzes ab. Bei langsamem Erhitzen bildet sich gewöhnlich zwischen 55 und 60° ein flockiges Koagulum.

Farbenreaktionen. Legumelin gibt alle charakteristischen Farbenreaktionen der Proteine.

Gehalt an Aminosäuren: (Erbse) vgl. [1]).

Stickstoffverteilung (Erbse)[2]). N als NH_3 1·04; basischer N 3·45; nicht basischer N 11·33; N im Mg O-Niederschlag 0·38%.

ANHANG.

Das Tuberin, das Globulin der Kartoffel.

Das Hauptprotein der Kartoffel ist ein Globulin[3]).

a) Darstellung des Tuberins.

Man extrahiert das gewaschene Kartoffelgewebe mit 10%iger Kochsalzlösung, filtriert den Extrakt und fällt das Globulin durch Dialyse. Man kann auch den filtrierten Preßsaft der Kartoffel mit Ammonsulfat sättigen und das Tuberin durch Lösen des so gewonnenen Niederschlages in Kochsalzlösung und etwa 14tägige Dialyse gewinnen. Der Niederschlag wird nach abermaligem Lösen und Fällen durch Dialyse mit destilliertem Wasser gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

b) Eigenschaften des Tuberins.

Elementare Zusammensetzung[2]). C 53·61; H 6·85; N 16·24; S 1·25; O 22·05%.

---

[1]) *Osborne* and *Heyl*: Hydrolysis of Coagulated Legumelin from the Pea. Journ. of biol. Chem. 5. 197 (1908).

[2]) *Osborne* and *Harris*: Nitrogen in Protein Bodies. Journ. Amer. Chem. Soc. **25**. 323 (1903).

[3]) *Zoellner*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **13**. 1064 (1880).

H i t z e k o a g u l a t i o n[1]). In 10%iger Kochsalzlösung bildet sich beim Erhitzen auf 60 bis 65° ein flockiger Niederschlag; die Koagulation wird erst bei längerem Erhitzen auf 80° vollständig.

L ö s l i c h k e i t. Tuberin löst sich in sehr verdünnten Salzlösungen, daher ist es durch Dialyse nur langsam und unvollkommen fällbar. Es fällt bei Totalsättigung mit Kochsalz, Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat aus. Essigsäure bewirkt einen im Überschuß der Säure löslichen Niederschlag.

G e h a l t a n A m i n o s ä u r e n u n d v a n S l y k e-N[2]).

---

[1]) *Osborne* and *Campbell*: Journ. of the Amer. Chem. Soc. **18**. 575 (1896).

[2]) *B. Sjollema* und *I. J. Rinkes*: Die Hydrolyse des Kartoffeleiweiß. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **76**. 368 (1912).

Darstellung von kristallisiertem Eiweiß.

Von **Fr. N. Schulz**, Jena.

Darstellung von kristallisiertem Eieralbumin aus Hühnereiern.

Das alte *Hofmeister*sche Verfahren[1]) besteht darin, daß nach Entfernung der Globuline durch Halbsättigung von Eiereiweiß mit Ammonsulfat durch spontanes Verdunsten von Wasser allmählich die Konzentration der erhaltenen Albuminlösung an Ammonsulfat bis zur unteren Fällungsgrenze des Eieralbumins gesteigert wird.

Hofmeister benützte dabei Eiereiweiß, das zunächst zu Schaum geschlagen und nach Zergehen des Schaumes filtriert wird. Es folgt dann zunächst die Ausscheidung des Eieralbumins in der Regel in Form von Kugeln (Globulithen, Spärolithen) oder von kugelförmigen Nadelaggregaten. Gelegentlich beobachtet man auch, daß schon bei der ersten Ausfällung isolierte Kristallnadeln auftreten. Diese beim ersten Ausfällen auftretenden Niederschläge werden auf dem Filter gesammelt, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann im Wasser aufgelöst und mit dem gleichen Volum konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt. Dann wird wieder durch spontanes Verdunsten aus flachen Schalen die Kristallisation eingeleitet. Man erhält nunmehr Kristallniederschläge, welche schon mehr oder weniger aus reinen Kristallnadeln ohne sichtbare Beimengungen bestehen. Beim mehrfachen Umkristallisieren werden die Kristalle immer kleiner und der Kristallbrei immer einheitlicher. Zur wirklichen Reindarstellung ist mehrfaches Umkristallisieren erforderlich, wie insbesondere aus den Beobachtungen von *Schulz* und *Zsigmondy*[2]) über die Goldzahl des kristallisierten Eieralbumins hervorgeht. Da, wo es auf möglichste Reinheit der Kristalle ankommt, ist es zweckmäßig, durch Feststellung der Goldzahl die Kontrolle auszuüben.

---

[1]) *Franz Hofmeister*: Über Darstellung von kristallinischem Eieralbumin und die Kristallisierbarkeit kolloidaler Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. **14**. 165 bis 172 (1889); Über die Zusammensetzung der kristallisierten Eieralbumine. Ebenda. **16**. 187 bis 199 (1891).

[2]) *Fr. N. Schulz* und *R. Zsigmondy*: Die Goldzahl und ihre Verwertbarkeit zur Charakterisierung von Eiweißstoffen. *Hofmeisters* Beitr. **3**. 137 bis 160 (1902).

Da das alte *Hofmeister*sche Verfahren zeitraubend ist und nicht immer zu guten Kristallpräparaten führt, auch nicht, wenn man durch Ausimpfen von Kristallen einer früheren Darstellung die Kristallisationsbedingungen verbessert, so wird man sich in der Regel des „Säureverfahrens" bedienen.

Das „Säureverfahren" nach *Hopkins* und *Pinkus*[1]): Zur Benützung kommt das Eierklar von möglichst frischen Eiern. Bei Verwendung von nicht frischen Eiern, auch wenn dieselben nach Geruch und Geschmack einwandfrei erscheinen, hat man häufig Mißerfolge (*Cohn*[2]).

Das vom Eigelb abgetrennte Eierklar kann man direkt mit dem gleichen Volum einer konzentrierten Lösung von Ammoniumsulfat versetzen und dann nach gründlichem Durchmischen von dem ausgeschiedenen Globulinniederschlag abfiltrieren. Ich ziehe es vor, das Eierklar zunächst mit etwa 2 Vol. Wasser zu verdünnen und erst dann zu der verdünnten Eierklarlösung das gleiche Volum konzentrierter Ammoniumsulfatlösung hinzuzufügen. Beim Versetzen des unverdünnten Eierklars mit Ammoniumsulfat macht das gründliche Durchmischen Schwierigkeiten, so daß leicht Gallertmassen von Eierklar übrig bleiben, die sich erst schwer und langsam mit der übrigen Flüssigkeit durchtränken. Zur gleichmäßigen Ausfällung der Globuline ist aber eine vollständige Durchmischung notwendig. Nach vollständiger Vermengung filtriert man von dem Globulinniederschlag ab. Wenn man vor dem Abfiltrieren zunächst einige Zeit wartet, so erleichtert man sich die Filtration. Mit dem Filtrat kann man nach *Hopkins* und *Pinkus* so verfahren, daß man zunächst konzentrierte Ammoniumsulfatlösung hinzugibt, bis eben ein deutlicher bleibender Niederschlag auftritt. Dann wird vorsichtig destilliertes Wasser hinzugefügt, bis der Niederschlag eben wieder verschwunden ist, und nunmehr mit 10%iger Essigsäure tropfenweise versetzt, bis zur deutlichen bleibenden Ausscheidung. *Cohn* setzt die Essigsäure direkt zu dem globu infreien Filtrat, das halb mit Ammoniumsulfat gesättigt ist. Man braucht dabei zirka 1·8 bis 2·0 cm^3 pro 100 cm^3 Filtrat.

Krieger[3]) benützt zur Ausfällung eine Schwefelsäure, die zirka 0·1 normal und halb mit Ammoniumsulfat gesättigt ist. Das *Krieger*sche Verfahren ist zunächst für die Darstellung von Serumalbuminkristallen aus Pferdeblut angegeben, läßt sich aber

---

[1]) *F. C. Hopkins* und *S. N. Pinkus*: Bemerkungen über die Kristallisation tierischer Albuminstoffe. Journ. of Physiol. **23**. 130 bis 136 (1898).

[2]) *Michael Cohn*: Notiz zur Darstellung kristallinischer Eiweißstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 41 bis 43 (1904).

[3]) *Hans Th. Krieger*: Über Darstellung kristallinischer tierischer Eiweißstoffe. Diss. Straßburg 1899.

wie Verfasser dartat[1]), mit gleichem Erfolg auch auf das Eieralbumin anwenden. Auch Salzsäure läßt sich verwenden (*Osborne*[2]). Die Ausscheidung erfolgt in Form von Kristalldrusen sowie von isolierten Kristallnadeln. Zum Umkristallisieren wird der auf dem Filter gesammelte Kristallbrei in Wasser gelöst und dann mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung bis zur beginnenden Fällung versetzt. Beim Umkristallisieren ist ein erneuter Säurezusatz nicht erforderlich. Auch hier verschwinden beim Umkristallisieren die Kristalldrusen und es treten isoliert liegende Nadeln auf, die bei jedem Umkristallisieren in der Regel kleiner werden. Auch in diesem Fall kann die Goldzahl zur Kontrolle der Reinheit dienen.

Zur Erzielung großer Kristalle kann man sich mit Erfolg der Erhöhung der Konzentration durch spontane Verdunstung bedienen. Wenn man den bei der ersten Kristallisation erhaltenen Kristallniederschlag in Wasser löst, die Lösung mit dem gleichen Volum konzentrierter Ammoniumsulfatlösung versetzt und dann die Mischung im Becherglas offen stehen läßt, so kann man mitunter Kristalle bekommen, die makroskopisch sichtbar sind.

Sörensen und *Höyrup*[3]) haben einge Modifikationen bei den oben geschilderten Verfahren gehandhabt. Sie geben zu dem globulinfreien, halb mit Ammoniumsulfat gesättigten Filtrat zunächst konzentrierte Ammonsulfatlösung bis zur bleibenden Trübung (z. B. auf 3300 cm^3 Filtrat zirka 140 cm^3 konzentrierte Ammonsulfatlösung). Dann wird n/5-Schwefelsäure zugesetzt, dabei löst sich zunächst die durch das Ammonsulfat entstandene Trübung, dann schlägt die rotgelbe Farbe ins Gelb um; es wird so lange n/5 H_2SO_4 zugesetzt, bis beim Auflösen des zunächst durch die Säure entstehenden Niederschlages die Flüssigkeit stark opalisierend bleibt. Es werden 500 bis 600 cm^3 n/5 H_2SO_4 gebraucht; je älter die Eier, desto mehr. Die Kristallisation wird durch Ausimpfen von Kristallbrei früherer Darstellungen unterstützt.

Wenn es sich darum handelt, möglichst aschefreies Eieralbumin zu gewinnen, benützt man reinstes Ammonsulfat (*C. A. F. Kahlbaum* liefert Ammonsulfat, das in 100 *g* weniger als 1 *mg* Asche enthält) und aschefreies Filtrierpapier (*Schleicher* und *Schüll* Nr. 590).

---

[1]) *Fr. N. Schulz*: Über Oxydation von kristallisiertem Eiereiweiß mit Wasserstoffsuperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 87 bis 104 (1899).

[2]) *Th. B. Osborne*: Über Eieralbumin. Journ. Amer. Chem. Soc. **21**. 477 bis 485 (1899).

[3]) *S. P. L. Sörensen* und *Margarethe Höyrup*: Proteinstudien. I. Mitt. Über Darstellung von Eieralbuminlösungen mit wohldefinierter Zusammensetzung nebst den angewandten analytischen Methoden. Zeitschr. f. physiol. Chem. **103**. 15 bis 79 (1918). Gleichzeitig erschienen in englischer Sprache in Compt. rend. des traveaux du Laboratorie de Carlsberg. **12**. (1916).

Nach *Panormoff*[1]) soll auch das Taubenei einen Albuminstoff enthalten, der nach dem *Hofmeister*schen Verfahren kristallisiert. Dasselbe gilt nach *Worms*[2]) auch für das Albumin des Eiweiß der Truthühnereier.

Darstellung von kristallisiertem Serumalbumin aus Pferdeblutserum.

Die Methode der Darstellung ist ganz analog der der Eieralbuminkristalle. Ein Unterschied besteht nur darin, daß es Pferdeblutsera gibt, die ganz besonders leicht kristallisiertes Albumin liefern. So hat *Gürber*, der Entdecker dieser Kristalle, dieselben mehrfach in schönster Weise erhalten, indem er dem durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat globulinfrei gemachten Serum einfach konzentrierte Ammoniumsulfatlösung hinzugab, bis zum Beginn einer bleibenden Trübung. Man erhält dann in manchen Fällen schon in ganz kurzer Zeit (eine oder wenige Stunden) prächtig ausgebildete Kristalle (Fig. 12). In manchen Fällen versagt aber dieses einfache Verfahren; man ist dann genötigt, sich des Verfahrens nach *Hopkins* oder nach *Krieger* zu bedienen. *Krieger* hatte in 17 Versuchen keinen Mißerfolg, aber eine sehr wechselnde Ausbeute. *Inagakis* Untersuchungen bestätigen diese Tatsache, daß im Pferdeserum das kristallisierende Albumin stets vorhanden ist. Nach Angaben *Gürbers* kann man auch mit Natriumsulfat Serumalbuminkristalle erzeugen. *Inagaki* stellte solche mit Ammoniumselenat dar. Für besondere Fragen ist das von Wichtigkeit.

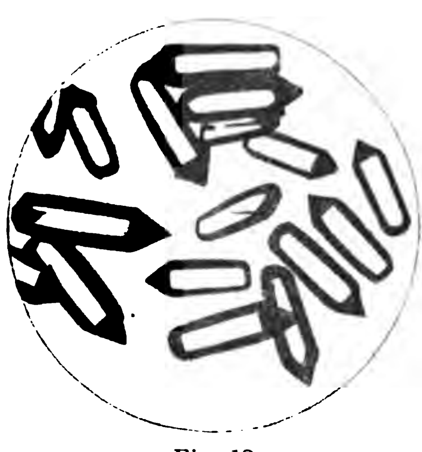


Fig. 12.

Zur Darstellung kann man defibriniertes Pferdeblutserum benützen oder aber auch das Plasma von durch Ammoniumoxalatzusatz (10% einer 1%igen Lösung) ungerinnbar gemachtem Pferdeblut. Die Ausbeute ist eine sehr wechselnde, auch ist der Grad der Reinheit der Kristallpräparate ein verschiedener. Namentlich bei Blut mit

[1]) *A. A. Panormoff*: Über Eigenschaften eines der im Taubenei enthaltenen Albumine. Journ. d. russ. phys. chem. Ges. **29**. 372, 398 bis 404 (1897).

[2]) *W. Worms*: Die Albumine des Eiweiß der Truthühnereier. Journ. d. russ. physiol. chem. Ges. **38**. 597 bis 607 (1906); *A. Gürber*: Kristallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. d. Physik.-med. Ges. zu Würzburg. **1**. 43 bis 46 (1894); siehe auch *A. Michel*: Zur Kenntnis der *Gürber*schen Serumalbuminkristalle. Mit einem Nachwort von *A. Gürber*: Verh. d. Physik. med. Ges. zu Würzburg. **29**. 117 bis 144 (1895); *C. Inagaki*: Zur Kenntnis der Eiweißkristallisation. Ebenda. **38**. 1 bis 17 (1905).

wenig kristallisierendem Albumin sind in der Regel amorphe Beimengungen vorhanden, die auch beim Umkristallisieren hartnäckig anhaften. Nach den Untersuchungen von *Inagaki* kommen für den Erfolg der Kristallisation zwei Momente in Betracht. Erstens das Auftreten von Kristallisationshindernissen, welche durch geeigneten Säurezusatz bei der Kristallisation im wesentlichen behoben werden können, und zweitens der jeweilige Gehalt an kristallisierendem Eiweiß. Daß für die wechselnden Ausbeuten beim Säureverfahren, wobei also die Kristallisationshindernisse beseitigt sind, der wechselnde Gehalt an kristallisierendem Eiweiß verantwortlich ist, darauf schließt *Inagaki* aus der Beobachtung, daß nach der Kristallausbeute auch die Menge des Ammoniaks wechselt, welche bei der Ausfällung mit Ammoniumsulfat frei wird. Während nämlich bei der Fällung von nicht kristallisierendem Eiweiß mit Ammoniumsulfat kein Ammoniak in nennenswerten Mengen frei wird, entstehen bei der Fällung des kristallisierenden Eiweiß beträchtliche Mengen von Ammoniak, die, wie gesagt, zur Ausbeute an Kristallen in direkter Beziehung stehen. *Inagaki* schließt daraus, daß die Pferdeserumalbuminkristalle Verbindungen von Albumin mit Schwefelsäure (bezw. Selensäure) sind. Nach *Gürber* und *Michel* erhält man aus Pferdeserum Kristallfraktionen, die sich nicht nur in der Form, sondern namentlich auch in ihren Löslichkeitsverhältnissen bezw. Fällungsverhältnissen gegen Ammoniumsulfat voneinander unterscheiden. Wie auch *Inagaki* glaubt, handelt es sich nach ihnen nicht um mehr oder weniger vollkommen ausgebildete Kristalle eines und desselben Körpers, sondern um verschiedene Körper (vielleicht um verschieden stark gesättigte Sulfate eines und desselben Albumins). Zur praktischen Verwertung eignet sich nur die in Fig. 12 abgebildete Kristallfraktion, die zuerst auftritt und auch an Masse überwiegt. Aus anderen Blutarten außer Pferdeblut sind Albuminkristalle bisher nicht mit Sicherheit erhalten worden.

Benützung der Kristalle von Eieralbumin und Serumalbumin zur chemischen Untersuchung.

Den Kristallpräparaten der besprochenen Albumine haftet die ammoniumsulfathaltige Mutterlauge an. Eine Entfernung dieser Mutterlauge ohne Aufhebung der Kristallnatur (die äußere Form läßt sich bei vorsichtiger Koagulation durch Hitze oder Alkohol gelegentlich erhalten) ist nicht möglich. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates kann man sich entweder der Dialyse oder des Auswaschens nach vorheriger Koagulation bedienen. Wenn es sich um die Gewinnung größerer Mengen handelt, bleibt nur der letztere Modus. Man löst den auf dem Filter gesammelten Kristallbrei in wenig Wasser und verfährt im übrigen nach den üblichen Regeln.

Genauere Vorschriften zur Befreiung des durch Kristallisation gereinigten Eieralbumins von Ammoniumsulfat, die sich auch auf Serumalbumin anwenden lassen, haben *Sörensen* und *Höyrup*[1]) gegeben. Die Reinigung durch Dialyse begegnet besonderen Schwierigkeiten, da das Eiweiß als amphoterer Körper sowohl Schwefelsäure als auch Ammoniak, aus Ammoniumsulfat stammend, zu binden vermag.

In einem besonderen Dialysierapparat, der es gestattet, eine ganze Reihe Dialysierzellen gleichzeitig einzuschalten, wird die durch Auflösen der Kristallmasse erhaltene Eiweißlösung in Kollodiumschläuchen zunächst während einer Woche gegen ausgekochtes destilliertes Wasser dialysiert. Verwendet werden Kollodiumschläuche von 200 *cm*³ Inhalt und Zellen von 600 bis 700 *cm*³ Außenflüssigkeit. Die Außenflüssigkeit wird in 24 Stunden dreimal gewechselt, bei jedem Wechsel läuft 1 *l* Wasser durch die Zelle. Der Dialysierapparat sowie die Darstellung der Kollodiumhäutchen sind eingehend im Original beschrieben. Nachdem so der wesentlichste Teil des Ammoniumsulfates entfernt ist, wird zur Freimachung der durch das Eiweiß gebundenen Schwefelsäure so viel Normal-Ammoniak zugesetzt, bis die Reaktion deutlich gegen Lackmuspapier alkalisch ist, und dann wieder eine Woche gegen ausgekochtes destilliertes Wasser dialysiert. Die Behandlung mit Normal-Ammoniak wird zum zweiten- und drittenmal wiederholt, bis das letzte Dialysat vor dem Zusatz von Ammoniak und das erste Dialysat nach dem erneuten Ammoniakzusatz frei von Schwefelsäure ist. Zur Prüfung auf Schwefelsäure wird 1 *l* Dialysat im Vakuum auf einige Kubikzentimeter eingeengt (unter Vermeidung des Zutrittes von schwefliger Säure) und dann mit Bariumchloridlösung geprüft. Nach dem letzten Ammoniakzusatz wird noch eine Woche dialysiert. Die so erhaltene Eiweißlösung enthält noch gebundenes Ammoniak, das durch besondere Methode bestimmt wird. Durch Dialyse läßt sich dieses Ammoniak nicht entfernen.

Verwendet man bei der Dialyse reichlich Toluol und niedere Temperatur, so erleidet das Eiweiß keine Veränderung. Das Eiweiß hat sein gutes Kristallisationsvermögen nicht eingebüßt. Werden Fäulnisbakterien nicht völlig ausgeschlossen, so wird ein wesentlicher Teil des kristallisierbaren Eiweiß in nicht kristallisierbares Eiweiß umgewandelt.

Über Darstellung von B l u t f a r b s t o f f k r i s t a l l e n siehe S. 185.

[1]) *S. P. L. Sörensen* und *Margarethe Höyrup*: Proteinstudien. I. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **103**. 15 bis 29 (1918). Gleichzeitig in englischer Sprache erschienen in Compt. rend. des traveaux du Laboratorie de Carlsberg. **12**. (1916).

Eigentliche Proteine.

Von **Franz Samuely** † und **Eduard Strauss**, Frankfurt a. Main.

Die Proteine finden sich im tierischen Organismus — von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen — in kolloider Lösung. Aus diesen Lösungen können wir die Proteine isolieren, indem wir sie aus dem Solzustand in den Gelzustand überführen. Erst die aus den Lösungen gefällten Proteine können dann einer weiteren Reinigung unterzogen werden. Nur für eine beschränkte Zahl von Eiweißkörpern ist bis jetzt die Überführung in einen kristallisierten Zustand gelungen. Offenbar sind die kristallisationsfähigen Substanzen solche Proteine, die bei der mit ihnen vorgenommenen Fällung einheitlich ausfallen und durch die Prozesse der Isolierung in ihren Eigenschaften wenig oder gar nicht verändert werden.

Die überwiegende Zahl von Proteinen ist nur in amorpher Form darstellbar. Die Momente, welche eine Kristallisation verhindern, lassen sich nicht übersehen. Gewiß fehlt es für manche Substanzen bis jetzt an den geeigneten Methoden, da es z. B. bis jetzt nicht gelungen ist, das in der Natur in Kristallform vorkommende Ichthulin nach seiner Isolierung wieder in den kristallisierten Zustand überzuführen. Ebenso sicher aber liegt die wesentliche Störung der Kristallbildung in der mangelnden Einheitlichkeit und der leichten Veränderlichkeit der isolierten amorphen Proteine. Erfahrungsgemäß ist für die Gruppe der Globuline sogar der Kontakt mit Wasser different, so daß diese Proteingattung hiebei irreversibel denaturiert, d. h. unlöslich wird. Unter diesen Bedingungen versteht sich die Schwierigkeit der Kristallbildung von selbst. Andererseits wissen wir, wie häufig geringfügige Kolloid- oder Salzbeimengungen die Eigenschaften eines anderen Kolloides beeinflussen. Nun pflegen wir die Proteine meist aus salzhaltigen Lösungen von Proteingemischen zu isolieren, deren quantitative Trennung kaum vollständig gelingt. Die kleinsten Spuren eines Proteins als Beimengung eines anderen können dessen Kristallisationsvermögen absolut verhindern. Unsere Methoden der Reinigung von solchen Beimengungen aber sind häufige Umfällungen oder Fraktionierung, d. h. Prozeduren, die ein Protein nicht unbeeinflußt lassen, so daß wir wiederum in den ersten Fehler im Versuch der Kristallerzeugung verfallen.

Wenn wir nun hinzufügen, daß unsere heutigen Methoden zur Darstellung amorpher Proteine in den wenigsten Fällen zu absolut reinen, einheitlichen Proteinkörpern führen, so wird es begreiflich, daß auch die Mehrzahl der Proteine bisher der Kristallisation widerstanden hat. Aus diesen einleitenden Worten geht aber bereits der Hinweis hervor, daß die in diesem Kapitel zu besprechenden Substanzen noch keineswegs als chemische Individuen in sensu stricto, sondern nur als mehr oder weniger gut studierte und erforschte Vertreter bestimmter Proteingattungen und Proteingruppen aufzufassen sind.

Methoden zum qualitativen Nachweis von Proteinen[1]).

Wir kennen als Mittel des qualitativen Eiweißnachweises zwei verschiedene Arten chemischer Reaktionen: 1. Koagulations- und Fällungsreaktionen und 2. Farbenreaktionen. Von jeder dieser beiden Gruppen sind Proben verwertbar; es muß aber bei jedem Proteinnachweis eine Mehrzahl von Reaktionen angestellt werden, um vor Täuschungen und Fehlschlüssen sicher zu gehen. So gibt es Proteine, die keineswegs in der Hitze koagulieren und doch die Farbenreaktionen geben. Andererseits sind in der großen Gruppe der Eiweißkörper solche vorhanden, denen diese oder jene Farbenreaktion fehlt. Schließlich gibt es eine Anzahl organischer Substanzen, welche die Fällbarkeit durch bestimmte Reagentien oder manche Farbenreaktion mit den Eiweißkörpern teilen, ohne selbst Proteine oder Proteide zu sein.

Daraus folgt aber die Notwendigkeit, sich niemals mit einer einzigen Probe zu begnügen; der negative Ausfall einer solchen entscheidet nicht unbedingt gegen eine Eiweißnatur. Auch hat die Anwendung mehrerer Eiweißreaktionen zugleich den Vorteil, über die Natur und Stellung eines Proteins in deren üblichem System Aufschluß zu geben. Und die Kenntnis von der Natur eines fraglichen Proteins ist gewiß von größerem biochemischen Interesse als die einfache Feststellung einer Substanz als „Eiweiß“.

Fällungsreaktionen.

1. Koagulation durch Hitze. Man erhitzt eine auf Eiweiß zu prüfende Lösung in der Flamme zum Kochen und fügt nach dem Kochen wenige Tropfen einer sehr verdünnten Säure (am besten Essigsäure oder Salpetersäure) hinzu. Bleibt bei schwach saurer Reaktion eine vorher auftretende Trübung in flockiger

[1]) Anmerkung: Diese Ausführungen mehr allgemeinerer Natur gelten im wesentlichen für die ganze Gruppe der Proteine. Sie sind an dieser Stelle erwähnt, weil die meisten Beobachtungen zuerst an Proteinen der Tierwelt gemacht worden sind und für die Pflanzenproteine manche Verhältnisse anders liegen. Der Herausgeber.



Form bestehen, so liegt ein koagulables Eiweiß vor; durch Farbenreaktionen des abfiltrierten oder in Alkali bezw. Säure als Alkali- bezw. Säurealbuminat gelösten Körpers ergänzt man die Feststellung. Im allgemeinen wird man stets solche Lösungen prüfen, die als physiologische oder pathologische Flüssigkeiten oder als künstliche Extrakte bereits salzhaltig sind. Handelt es sich aber um salzfreie oder sehr salzarme Lösungen, in welchen die sichtbare Fällung des durch die Hitze denaturierten Eiweiß ausbleibt, so fügt man vor der Erhitzung ein Salz, z. B. Kochsalz, Kaliumphosphat oder Natriumsulfat, hinzu.

Die Proteine koagulieren bei bestimmten Koagulationstemperaturen, die für einzelne Proteine spezifische Konstanz aufweisen.

Bestimmung der Koagulationstemperatur. Man bringt die zu prüfende Eiweißlösung in eine mittelgroße Eprouvette. Die Höhe der Eiweißlösung in derselben soll etwa 5 bis 6 *cm* betragen. Dieses Reagenzglas taucht man in ein mit Wasser gefülltes Becherglas derart, daß der äußere Wasserspiegel das Niveau der Eiweißlösung um weniges überragt. In die Außenflüssigkeit und in die Eiweißlösung taucht ein Thermometer. Für gute Temperaturablesungen ist es auch zweckmäßig, das Thermometer nicht in die Eiweißlösung selbst, sondern in ein mit Wasser gefülltes zweites Reagenzglas tauchen zu lassen, das ebenso wie jene die Eiweißlösung beherbergende Eprouvette in das Becherglas versenkt ist. Das in diesem Wasserbad befindliche Wasser wird nun vorsichtig und langsam unter gutem Durchmischen mit einem Glasring erwärmt, wie dies bei den Schmelzpunktsbestimmungen geschieht.

Der Beginn der Koagulation ist an einer milchigen Trübung erkenntlich, die mit weiterem Steigen der Temperatur einer absoluten Undurchsichtigkeit der Lösung und mit beendeter Koagulation einer flockigen Abscheidung weicht; für alle drei Stadien der Eiweißfällung sind die Temperaturen zu notieren. Desgleichen wiederholt man die Bestimmung bei schnellem Erwärmen des Wasserbades und nach Eintauchen der Proteinlösung in das bereits bis nahe an die Koagulationstemperatur vorgewärmte Wasserbad.

Man hat daran festzuhalten, daß die Koagulationstemperatur von zahlreichen Momenten nach oben oder unten beeinflußt wird, so von der Schnelligkeit des Erwärmens, dem Salzgehalt und der Reaktion der Lösung, sowie von der Konzentration des gelösten Eiweißes selbst.

Vor allem muß im Gegensatz zu früheren Gewohnheiten, wenn möglich, jede gefundene Koagulationstemperatur (d. h. die Temperatur der flockigen Fällung) mit einem Vermerk über den Salzgehalt der Lösung und die Eiweißkonzentration versehen werden.

Die Gerinnungspunkte der Proteine scheinen durch das Aussalzen erniedrigt zu werden[1]). Koagulation tritt auch unter Druck ein; Hühnereiweiß koaguliert bei Zimmertemperatur unter sehr starkem hydrostatischem Druck in einer halben Stunde[2]).

2. Fällung durch konzentrierte Salpetersäure. Man unterschichtet die Eiweißlösung mit einer kleinen Menge kalter konzentrierter Salpetersäure. An der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten entsteht bei Anwesenheit von Eiweiß ein weißer Ring eines Niederschlages. Es ist stets ratsam, diese sogenannte *Heller*sche Probe durch Schichtung auszuführen. Da es Proteine gibt, z. B. Albumosen, deren Fällung im Säureüberschuß löslich ist, so bewahrt die Schichtprobe vor Irrtümern. Andererseits kann man sich durch Umschütteln der Lösungen nachträglich noch über eine eventuelle Löslichkeit des Präzipitats unterrichten.

3. Auch alle folgenden Eiweißproben durch Fällung mit Metallsalzen oder sogenannten Alkaloidreagentien sind vorsichtig erst mit kleinen Zusatzmengen und dann erst mit einem Überschuß des Fällungsmittels auszuführen. Als solche dienen: Kupfersulfat, Kupferazetat, Quecksilberchlorid, Eisenchlorid, Eisenazetat, Bleiazetat, Zinkazetat, Uranylazetat, Platinsalze und Kobaltsalze.

Da sich die verschiedenartigen Eiweißkörper gegen diese Metallsalze sehr verschiedenartig verhalten, so werden diese Reagentien weniger zum qualitativen Nachweis des Eiweiß als vielmehr zur Feststellung ihrer Gruppenzugehörigkeit verwendet.

Die gebräuchlichen „Alkaloidreagentien" sind: Wasserstoffplatinchlorid, Wasserstoffquecksilberjodid, Wasserstoffwismutjodid, Metaphosphorsäure, Molybdänsäure, Phosphormolybdänsäure, Wolframsäure, Phosphorwolframsäure, Allotellursäure, Ferrozyanwasserstoffsäure und Gerbsäure.

Von diesen komplexen organischen Säuren, die alle in stark sauren Eiweißlösungen von großer Verdünnung Fällungen erzeugen, sind für den rohen qualitativen Nachweis nur die beiden letzteren praktisch verwertbar.

4. Man säuert die fragliche eiweißhaltige Lösung mit Essigsäure oder Salzsäure stark an und fügt zu ihr einige Tropfen einer 15%igen Lösung von Ferrozyankalium. Eine sofort mit jedem Tropfen zunehmende Trübung beweist die Anwesenheit von Eiweiß. Auch hier ist in der Menge des Fällungsmittels Vorsicht geboten, da es Proteine gibt, welche im Überschuß des Fällungsmittels löslich sind.

---

[1]) *Karl Micko*: Über die Gerinnungspunkte des Eier-, Serum- und Milchalbumins usw. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrgs.- u. Genußm. **21**. 646 (1911).

[2]) *P. W. Bridgman*: Koagulierung von Eiweiß unter Druck. Journ. of Biol. Chem. **19**. 511 (1914).

Das auf dem Filter gesammelte Präzipitat gibt noch die Farbenreaktionen des Eiweiß.

5. Die Gerbsäure wird am zweckmäßigsten in Form der sogenannten *Almen*schen Lösung verwandt, welche 4 *g* Gerbsäure in 8 cm^3 25%iger Essigsäure + 190 cm^3 40 bis 50%igen Alkohol enthält. Die Probe ist für genuine Eiweißkörper außerordentlich empfindlich.

6. Fällung durch organische oder anorganische Säuren (Essigsäure, Salzsäure usw.). Von den bisher genannten Fällungen ist diejenige Niederschlagsbildung zu unterscheiden, die auf dem Zerlegen eines Alkalieiweißsalzes in das freie Eiweiß mit Säurecharakter durch eine stärkere Säure beruht. Man achte in jeder Eiweißprobe auf diese Erscheinung, da auf diesem Weg der erste Anhaltspunkt über die Gruppenzugehörigkeit eines Proteins gewonnen wird. Eine solche Fällung ist eine reversible, d. h. der Körper ist nicht denaturiert und wieder in Alkalien löslich.

Jede solche Fällung hat mit einem Minimum von Säurezusatz zu beginnen, um die Möglichkeit einer Lösung im Säureüberschuß zu vermeiden bezw. später zu konstatieren oder Verwandlung in Umwandlungsprodukte (Azid- oder Alkalialbuminat) zu verhindern.

Eiweißfarbenreaktionen.

1. Biuretprobe. Man führt die Probe nur an Eiweißlösungen aus. Liegt ein wasser- oder alkaliunlöslicher Körper vor, so verwandelt man ihn durch Kochen mit heißer Lauge in ein lösliches Albuminat. Zu der kalten Lösung setzt man einen Überschuß Natronlauge und dann ein bis zwei Tropfen einer sehr verdünnten, kaum mehr gefärbten Kupfersulfatlösung. Es entsteht eine blauviolette bis rotviolette Färbung. Histone und Peptone geben die Probe mit einem Stich ins Burgunderrote. Jeder Überschuß von Kupfersulfat ist zu vermeiden, da sonst die violette Farbe verdeckt wird. Es empfiehlt sich auch hier, die Kupfersulfatlösung zu überschichten und eine langsame Diffusion beider Flüssigkeiten abzuwarten.

Die Probe gilt allgemein als eindeutig für Eiweißkörper. In jüngster Zeit aber sind synthetische Polypeptide dargestellt, welche diese Reaktion auch geben.

Im Verein mit der Ferrozyankaliumprobe aber ist die Biuretprobe entscheidend.

Es ist wichtig, die Biuretprobe nicht in Gegenwart größerer Mengen Ammonsalze vorzunehmen, da diese die Reaktion stören. Will man also die Probe an Fällungen, die durch Aussalzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewonnen sind, vornehmen, so ver-

wendet man starkes Alkali. Hiedurch wird das Ammonsalz zersetzt. Dem alkalischen Filtrat fügt man dann zehn Tropfen einer Kupfersulfatlösung (2:100) hinzu.

Statt Kupfersalzen kann man auch Nickelsalze verwenden und erhält hiebei orangerote Farbe.

2. Die folgenden Reaktionen werden durch die Anwesenheit ganz bestimmter Bausteine im Eiweißmolekül vermittelt. Sie gestatten also einen indirekten Schluß auf die partielle Zusammensetzung und dadurch auch auf die Gruppenzusammengehörigkeit der Proteine. An sich sind sie nicht für ein Protein entscheidend, da sie auch mit jenen aus dem Proteinmolekül herausgelösten freien Bausteinen (Aminosäuren oder Kohlehydratgruppen) positiv ausfallen. Da wir im Laufe biochemischer Arbeiten solchen freien Substanzen nicht selten begegnen, so sind die Proben zum qualitativen Nachweis von Eiweiß in Lösungen tierischer Sekrete oder Produkte nicht geeignet. Ihr positiver Ausfall aber ist verwertbar, wenn die Proben an isolierten, gereinigten, genuinen oder denaturierten Proteinsubstanzen ausgeführt werden. Sie dienen also weniger dem Nachweis, als einer ergänzenden Identifikation.

Xanthoproteinreaktion. Man versetzt eine Lösung oder einen festen Körper, den man auf Eiweiß prüfen will, mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure und erhitzt langsam. Bei Eiweißgegenwart tritt eine zitronengelbe Färbung auf, die auf Zusatz von überschüssigem Alkali (NH_3 oder $NaOH$) in eine orangerote Farbe umschlägt.

Man kann bei positivem Ausfall anderer Farbenreaktionen auf diese Probe verzichten. Sie ist für Eiweiß nur dann eindeutig, wenn die zu prüfende Lösung nicht andere organische aromatische Substanzen enthält, die gleichfalls einer Nitrierung verfallen können.

*Millon*sche Reaktion. Man fügt zu einer Eiweißlösung etwas *Millon*sches Reagens. (1 Teil Hg wird in 2 Teilen HNO_3 vom spezifischen Gewicht 1 42 erst in der Kälte, dann durch Erwärmen vollständig gelöst. Nach dem Erkalten wird mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünnt und von einem abgeschiedenen Bodensatz getrennt.) Es entsteht zunächst ein farbloser Niederschlag, der sich bei gelindem Erwärmen schön himbeerrot färbt. Auch die Flüssigkeit nimmt diese Färbung an. Da größere Mengen Kochsalz den positiven Ausfall der Probe hemmen können, so verwendet man möglichst verdünnte Lösungen. Die Probe ist durch die Anwesenheit aromatischer Phenolgruppen bedingt.

Die sonst bekannten Eiweißfarbenreaktionen, wie die Reaktion von *Hopkins* und *Cole* bezw. *Adamkiewicz*, die *Liebermann*sche Reaktion, die Reaktion von *O. Neubauer* und *Rohde*, die Schwefelblei-

reaktion und die Reaktion von *Molisch*, dienen weniger dem qualitativen Nachweis einer auf Eiweiß zu prüfenden Lösung, als vielmehr dem Nachweis bestimmter Bausteine und Molekülkomplexe in einem bereits als Eiweiß erkannten Körper. Ihre Besprechung liegt daher nicht im Bereich dieses Kapitels. Ebenso wird die Ninhydrin-Reaktion als Nachweis von Eiweißabbauprodukten an anderer Stelle zu besprechen sein.

Über das Aussalzen der Proteine.

Trennung von Eiweißkörpern aus Gemischen. Alle Proteine werden durch Neutralsalze oder Metallsalze aus ihrer wässerigen Lösung ausgesalzen. Diese Art der Fällung ist eine reversible Aggregatsveränderung der Proteine, die gefällte Eiweißsubstanz wird nicht denaturiert und bleibt ohne Verlust ihrer chemischen Eigenschaften in den geeigneten Lösungsmitteln löslich. Die quantitative Ausfällung eines in Lösung befindlichen Proteins hängt von der Natur und der Menge des zur Aussalzung verwandten Salzes oder, was dasselbe ist, von dem Sättigungsgrad der Eiweißwassermischung an Salz ab. Es hat sich nun gezeigt, daß die die Ausfällung eben auslösenden und die eine quantitative Ausfällung beendenden Sättigungsgrade Konstanzen sind, welche sowohl von der spezifischen Natur eines Proteins als auch von der Natur des fällenden Salzes bedingt werden. Das ganze Studium dieser Verhältnisse hat nun für ein einheitliches Salz jene fällenden Sättigungsgrade an verschiedenen Proteinen festgestellt. Da nun, wie sich ergab, die Sättigungsgrenzen relativ wenig mit der Eiweißkonzentration einer Proteinlösung schwanken, da sich diese Grenzwerte auch in Eiweißgemischen nicht wesentlich verändern und da schließlich die Sättigungsgrenzen eines einzigen Salzes eine spezifische Funktion einer ganz bestimmten Proteinklasse darstellt, so bietet die Anwendung der Aussalzung die Möglichkeit, Eiweißkörper durch Fraktionierung voneinander zu trennen oder isolierte Proteinsubstanzen auf ihre Reinheit und Einheitlichkeit zu prüfen.

Natürlich bieten diese Methoden der Aussalzung heute auch die Mittel, die Gruppenzugehörigkeit eines Proteins in unserer üblichen Eiweißkörpersystematik festzustellen. Historisch betrachtet, liegt die Sache nun eher umgekehrt. Denn das Verhalten der Proteine gegen Salzlösungen hat gerade zu unserer vorläufigen und willkürlichen Systematik geführt. Nachdem sich aber auch chemisch-analytische Momente ergeben haben, welche diese Systematik als begründet und brauchbar erwiesen haben, dürfen wir heute ruhig sagen, daß die Bestimmung der Salzfällungsgrenzen ein erfreuliches Mittel zur Identifizierung der Gruppenzugehörigkeit eines Proteins bedeutet.

Man wird also in vielen Fällen eines positiven Proteinnachweises auch orientierende Versuche über die Salzfällbarkeit

der fraglichen in Lösung befindlichen Eiweißkörper anstellen. Als fällende Salze werden verwendet: $NaCl$, $MgSO_4$, Na_2SO_4, Am_2SO_4, CH_3COOK, $ZnSO_4$.

Methode zur Bestimmung der Fällungsgrenzen eines in Lösung befindlichen Eiweißkörpers durch Aussalzen mit Hilfe von Neutralsalzen oder Metallsalzen (obere und untere Sättigungsgrenze[1]):

Die Proteine werden durch gewisse Neutral- oder Metallsalze ausgesalzen. Die Abscheidung eines Proteins aus seiner Lösung beginnt dann, wenn die Lösung eine für jede Gruppe von Eiweißkörpern und für jedes angewandte Salz spezifische Salzkonzentration erreicht hat (untere Fällungsgrenze). Die Abscheidung schreitet dann mit dem Steigen des Salzgehaltes bis zu einer zweiten, ebenso spezifischen Konzentration fort (obere Sättigungsgrenze). Mit dieser Grenze ist die Abscheidung eine quantitative. Weiterer Salzzusatz führt nicht zur Abscheidung, es sei denn, daß es sich um Lösungen von Eiweißgemischen handelt, in denen die obere Sättigungsgrenze eines Körpers mit der unteren Sättigungsgrenze eines zweiten Proteins zusammenfällt. Um also diejenige Salzkonzentration zu bestimmen, bei der die Abscheidung eines Proteins oder einer Proteinfraktion beginnt, steigert man in gleichen abgemessenen Proben, z. B. durch Zufuhr von Ammonsulfat, den Salzgehalt der zu prüfenden Lösung bis zum Beginn einer Trübung und fährt dann mit dem Salzzusatz so lange fort, bis eine Filtratprobe von dem entstandenen Niederschlag bei weiterem Salzzusatz keine Fällung mehr erzeugt. Handelt es sich um Lösungen mehrerer Eiweißkörper, so fährt man mit dem Salzzusatz auch dann noch weiter fort. Zunächst entstehen keine weiteren Trübungen. Von einem bestimmten Salzgehalt ab tritt wieder Trübung auf (untere Fällungsgrenze des zweiten Proteins). Nach vollständiger Aussalzung dieses zweiten Proteins läßt sich durch weiteren Salzzusatz keine Trübung mehr erreichen. Damit ist die obere Fällungsgrenze des zweiten Proteins erreicht bezw. überschritten.

Ausführung[2]): Als Fällungsmittel dienen gesättigte, kalte, neutrale Salzlösungen, z. B. neutrale, kalt gesättigte Ammonsulfatlösungen.

Mit einer Pipette mißt man in zahlreichen Reagenzgläsern je 2 cm^3 der zu untersuchenden Eiweißlösung oder einer Lösung

---

[1]) Hiezu ist der Abschnitt über Aussalzen durch Neutralsalze unter „Pflanzenproteine" zu vergleichen (dieses Handbuch, S. 391.)

[2]) *F. P. Pick*: Untersuchungen über die Proteinstoffe. II. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 246 (1897); Zur Kenntnis der peptischen Spaltprodukte der Fibrine. Ibid. **28**. 219 (1897). (Vgl. hiezu S. 361, Note 2 und 3.)

des vorher rein dargestellten Proteins ab. In dieser Lösung bestimmt man vorher den Prozentgehalt an Eiweiß. Im allgemeinen prüft man die Fällungsgrenzen an 5%igen künstlichen Eiweißlösungen. Auch die Reaktion der Lösung ist zu beobachten und zu verzeichnen.

Diese Proben versetzt man nun mit einer gleichmäßig zu nehmenden, in der Pipette abzumessenden Menge der Ammonsulfatlösung, indem man den Salzgehalt jeder nächstfolgenden Probe um 0·2 cm^3 der gesättigten Salzlösung steigert. Jede der angestellten Proben wird hierauf mit destilliertem Wasser auf das gleiche Volumen von 10 cm^3 aufgefüllt. Die Reihenfolge der Mischung ist zweckmäßig: Eiweißlösung, Wasser, Salzlösung. Die Konzentration, bei der die erste bleibende Trübung auftritt, wird als untere Fällungsgrenze verzeichnet.

Nunmehr läßt man die gut durchgemischten Proben, die durch Gummikappenverschluß der Eprouvetten vor Verdunstung geschützt sind, am besten 24 Stunden stehen, um die Abscheidung der Proteinfällung quantitativ zu Ende gehen zu lassen. Alsdann filtriert man die Proben durch doppeltes Papierfilter und prüft die klaren Filtrate auf einen etwa nicht ausgefällten Eiweißrest oder einen erst bei höherer Salzkonzentration ausfallenden Körper durch Zusatz von je 0·2 bis 0·3 der gesättigten Salzlösung zu jeder Filtratprobe. Das hiebei zuerst vollständig klar gebliebene Gemisch zeigt die Probe an, in welcher die obere Sättigungsgrenze für den ursprünglich in Lösung gegebenen Körper erreicht war.

Um die notierten Sättigungsgrenzen vergleichbar zahlenmäßig auszudrücken, bezeichnet man dieselben mit derjenigen Anzahl Kubikzentimeter der gesättigten Salzlösung, die in einem Gesamtvolumen von 10 cm^3 eine erste Trübung erzeugt oder zur quantitativen Abscheidung ausgereicht hat.

Wenn also in einer 1%igen Eiweißlösung von 2 cm^3, die mit 5·2 cm^3 Wasser versetzt war, durch 2·8 cm^3 gesättigter Salzlösung die erste Trübung entsteht, so ist die untere Fällungsgrenze für den in Frage stehenden Körper 2·8 oder 28%. Bei Bestimmung solcher Zahlen ist es aber dringend nötig, dieselbe durch Angabe der Eiweißkonzentration und Reaktion der ursprünglichen Eiweißlösung zu ergänzen, da diese Fällungsgrenzen keineswegs physikalische Konstanten sind.

Wohl zu unterscheiden von diesen so bestimmten Zahlen sind jene Grenzwerte, die etwa durch Fällungen mit gepulvertem Salz in Substanz bestimmt sind. In solchen Fällen drückt man die Sättigungsgrenzen eines Proteins nicht in Kubikzentimetern einer gesättigten Salzlösung, sondern durch den absoluten Prozentgehalt der Eiweißlösung an zugesetztem Salz aus.

Methode der fraktionierten Eiweißfällung durch Aussalzen mit gesättigten Neutralsalzlösungen.

Sind in einer Lösung zwei oder mehrere Eiweißkörper enthalten, deren obere bezw. untere Fällungsgrenzen miteinander nichtzusammenfallen, so kann man dieselben fraktioniert aussalzen, d. h. man fügt zu der in Frage stehenden Lösung so viel gesättigter Salzlösung hinzu, daß die obere Sättigungsgrenze des ersten Körpers erreicht ist, filtriert ihn ab, wäscht mit einer dieser Sättigungsgrenze entsprechend verdünnten Salzlösung aus und steigert nun in den vereinigten Filtraten den Salzgehalt derart, daß die Sättigungsgrenze des zweiten Proteins überschritten wird.

Vielleicht ist es zweckmäßig, an dieser Stelle die mathematischen Formeln wiederzugeben, nach denen man die Mengen der gesättigten Salzlösung bestimmt, die nötig sind, um eine Eiweißlösung auf einen gewünschten Sättigungsgrad, d. h. Gehalt an gesättigter Lösung, oder eine bereits zu einem bekannten Prozentsatz mit Salzlösung gesättigte Lösung auf einen nächst höheren, gewünschten Sättigungsgrad zu bringen. Wir erinnern dabei daran, daß sich der Begriff Sättigung in Prozenten nicht auf den Gehalt an Ammonsulfat, sondern auf die Volumina gesättigter Salzlösung bezieht.

I. Es sei A die Menge einer beliebigen Eiweißlösung in Kubikzentimetern. Dieselbe soll durch Z cm^3 einer gesättigten Salzlösung zu $\frac{a}{b}$ gesättigt werden.

Dann ergibt sich

$$\frac{A + Z}{Z} = \frac{b}{a}, \text{ woraus folgt: } Z = \frac{a \,.\, A}{b - a}$$

II. Es sei A eine Menge einer Eiweißlösung in Kubikzentimetern, die bereits zu $\frac{a}{b} = s$ mit einer Salzlösung gesättigt ist. Dieselbe soll durch Zusatz einer unbekannten Menge Z der gleichen gesättigten Salzlösung auf ein Sättigungsverhältnis von $\frac{a_1}{b_1}$ gebracht werden. Dann ergibt sich:

$$\frac{A + Z}{A \,.\, s + Z} = \frac{b_1}{a_1}, \text{ also } Z = \frac{A \,.\, (b_1 s - a_1)}{a_1 - b_1}$$

Beispiel: Es sollen aus einer Eiweißlösung von 100 cm^3 zwei Eiweißkörper gefällt werden, deren erster bei einer Sättigung von zwei Dritteln, d.h. 66·6% gesättigter Ammonsulfatlösung und deren zweiter bei einer solchen von vier Fünfteln, d.h. 80% Salzlösung gefällt wird.

$Z = \frac{2 \cdot 100}{3 - 2} = 200$. Ich füge also zu 100 *cm*³ Eiweißlösung 200 *cm*³ der gesättigten $Am_2 SO_4$-Lösung. In den entstehenden 300 *cm*³ sind 200 *cm*³ gesättigter Salzlösung enthalten, also die Sättigung beträgt zwei Drittel. Ich filtriere von dem Niederschlag ab und wasche mit einer zwei Drittel gesättigten $Am_2 SO_4$-Lösung gut aus. (Die Lösung wird hergestellt aus 2 Teilen gesättigter Salzlösung + 1 Teil destillierten Wassers.) Das Gesamtvolumen des gewonnenen Filtrates beträgt 400.

$$Z = \frac{400 \cdot (5 \cdot {}^2/_3 - 4)}{4 - 5} = \frac{-266{\cdot}7}{-1} = +266{\cdot}7.$$

Ich füge also zu den 400 *cm*³ noch 266·7 *cm*³ der gesättigten Salzlösung hinzu. Es fällt das zweite Protein aus, denn die entstehenden 666·7 *cm*³ der Flüssigkeit enthalten 266·7 *cm*³ Salzlösung von der zweiten Fällung + 266·7 *cm*³ von der ersten Fällung samt der Verdünnung, d. h. im ganzen 533·4 *cm*³ gesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung, d. h. die Lösung ist zu vier Fünfteln gesättigt.

Zur Systematik der Proteine.

Identifikation eines Proteins als Glied einer bestimmten Proteinklasse.

Die Methoden, welche das in der Überschrift bezeichnete Ziel verfolgen, ergeben sich aus den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine aus dem einfachen Grunde, weil unsere Systematik willkürlich nur aus der Kenntnis dieser Eigenheiten aufgebaut ist. Wenn es auch den Anschein hat, daß chemische Differenzen tatsächlich die vorläufig gebildeten Gruppen auszeichnen, so müssen wir doch eingestehen, daß unsere Systematik von heute nur den Versuch einer Gliederung der so vielseitigen Eiweißkörper darstellt.

Auf S. 472 und 473 geben wir eine Tabelle wieder, in der die großen Gruppen der Proteinsubstanzen verzeichnet sind und in die zugleich diejenigen Eigenschaften aufgenommen sind, welche heute die Anhaltspunkte für die Zusammengehörigkeit solcher Gruppen liefern. Daß selbst innerhalb der Glieder einer einzigen Gruppe Unterschiede der Eigenschaften vorkommen, versteht sich. Wir kennen fließende Übergänge von einer Gruppe zur anderen. Es ist daher auf die Mitteilung von Spezialreaktionen verzichtet. Nur diejenigen Reaktionen und Eigenschaften sind verzeichnet, die von genereller Bedeutung sind. Man ersieht aus der Tabelle, daß gerade diejenigen Reaktionen für eine Identifizierung wesentlich sind, die wir bereits zum qualitativen Nachweis dieses Proteins und zur Reinigung und Isolierung eines solchen angeführt haben.

Reagentien	Albumine	Globuline	Nukleo-albumine	Vitelline
Spezial-reaktionen	—	—	Paranuklein bei Verdauung, phosphorhaltig	P-haltig, zum Teil eine Kohle-hydratgruppe enthaltend
Wasser	Löslich	Meist unlöslich	Unlöslich	Unlöslich
Kochen	Koaguliert nur bei Salz-gegenwart	Koaguliert bei Salz-anwesenheit	Nicht koaguliert, nur die Salze koagu-lieren	Koaguliert
Alkohol	Gefällt und koaguliert	Gefällt und koaguliert	Gefällt und koaguliert	Gefällt, nicht koaguliert
5 bis 10%ige Lösung von Neutralsalzen	Löslich	Löslich	Unlöslich	Löslich in 10% Na Cl, sonst unlöslich*)
Gesättigte Lö-sung von Na Cl	Bis 100% nicht gefällt*)	Zum Teil 100% gefällt	Als Salze fällbar	—
Desgleichen von $Mg SO_4$	Bis 100% nicht gefällt*)	100% gefällt	Als Salz fällbar	—
Desgleichen von $Am_2 SO_4$	Bei 100% ganz gefällt	50% gefällt	Als Salz fällbar	—
Verdünntes Alkali Na OH oder NH_3	Löslich, in Alkali-albuminat übergehend	Löslich, verw. in Alkali-albuminat	Löslich	Löslich
Verdünnte Säuren	Löslich, sehr leicht in Azid-albuminat übergehend	Fällbar aus alkal. Lösung, Überschuß löslich zu Azidalbuminat	Gefällt, schwer löslich im Überschuß von CH_3COOH	Gefällt, aus alkalischer Lösung, im Überschuß zum Teil löslich
Konzentrierte Mineralsäuren	Gefällt	Gefällt	Löslich	Gefällt
Konzentrierte Salpetersäure	Gefällt, Wärme unlöslich	Gefällt, Wärme unlöslich	Gefällt, löslich im Überschuß	Gefällt
Ferrozyankali + Essigsäure	Gefällt	Gefällt	Gefällt	Gefällt
Gerbsäure + Mineralsäure	Gefällt	Gefällt	Gefällt	—
Phosphor-wolframsäure	Gefällt	Gefällt	Gefällt	—
Bemerkungen	*) Bei saurer Reaktion durch 100% Na Cl oder $Mg SO_4$ gefällt	Kristalline sind in Wasser löslich	Die Reaktionen sind nur mit den wasserlöslichen Alkalisalzen aus-führbar	*) Ichthulin in verdünnten Neutralsalzen löslich

Die Protamine und eiweißartigen Abbauprodukte



Nukleoproteide	Schleim-substanzen	Proteinoide	Histone	
P-haltig, Purinbasen-, Pyrimidinbasen-, Kohlehydrathaltig	Enthalten zum Teil Glukosamin und zum Teil Chondroitinschwefelsäure	Zum Teil gegen Fermente resistent	—	
Unlöslich, Salze sind löslich	Löslich	Meist unlöslich	Unlöslich, nur als Salze löslich	
Nicht koaguliert	Nicht koaguliert, zum Teil leicht verändert	Nicht fällbar, nicht koaguliert	Gefällt, Koagulat leicht löslich in Säuren	
Gefällt, nicht koaguliert	Gefällt, nicht koaguliert	Zum Teil aus saurer Lösung fällbar	Gefällt	
Unlöslich	Löslich	Unlöslich	Unlöslich	
Gefällt	Fällbar	Zum Teil fällbar (Kollagen)	Gefällt	aus neutraler Lösung
Gefällt	Fällbar	Zum Teil fällbar (Kollagen)	Gefällt	
Gefällt	Fällbar	Zum Teil fällbar	Gefällt	
Löslich	Löslich	Löslich	Unlöslich auch im NH_3-Überschuß*)	
Unlöslich, d. h. aus Salzen fällbar, zum Teil schwer löslich im Überschuß von Essigsäure	Gefällt, unlöslich im Überschuß	Gefällt	Löslich	
Gefällt	—	Gefällt	Nicht fällbar	
Gefällt	—	Gefällt	Fällbar, löslich in der Wärme, wiederkehrend in der Kälte	
Gefällt	Nicht gefällt (Ausnahmen vorhanden!)	Gefällt	Gefällt	
—	Gefällt	Wenn wasserlöslich, gefällt	—	
—	Gefällt	Zum Teil gefällt	—	
Geben bei Pepsin-HCl-Verdauung Nukleine, bezw. durch Säurehydrolyse Nukleinsäuren	Pseudomuzin ist mit Essigsäure nicht fällbar	—	*) In Überschuß von fixem Alkali löslich	

(Albumosen und Peptone) sind nicht verzeichnet.

Je genauer diese dort beschriebenen Proben und Methoden befolgt werden und je zahlreicher die ausgeführten Vorproben sind, um so leichter wird die Identifikation eines Proteins gelingen, und nur in wenigen Fällen wird eine Analyse des dargestellten Proteins nötig werden.

Man wird nach Ausführung der Vorproben in der Tabelle sofort die Zugehörigkeit eines Proteins zu dieser Gruppe feststellen oder sicher zu anderen Gruppen ausschließen können.

Man bestimme die folgenden Punkte:

1. Feststellung, ob ein durch Hitze koagulables Eiweiß vorliegt und Bestimmung, ob im Filtrat dieses koagulablen Proteins noch ein anderer nicht koagulabler Eiweißkörper enthalten ist (Anstellung der Biuretprobe und Ferrozyankaliprobe).

2. Wiederholung dieses Versuches unter Anwendung von absolutem Alkohol im Überschuß als denaturierendes Agens.

3. Feststellung der Salzfällbarkeit des fraglichen Proteins durch Zusatz gesättigter Salzlösungen (mindestens zwei Salze: $Mg\,SO_4$ und $Am_2\,SO_4$) in verschiedenen Volumverhältnissen (Halbsättigung, Zweidrittelsättigung, Ganzsättigung) unter Untersuchung der Filtrate auf Fraktionen, die erst bei höherer Salzsättigung ausfallen.

4. Kontrolle über die Löslichkeit der durch Aussalzen gewonnenen Körper, in Alkali, Säure, in salzhaltigem Wasser oder salzfreiem Wasser (durch Dialyse der salzhaltigen Lösung). Der Dialysenversuch kann auch mit der ursprünglichen Lösung der Proteine ausgeführt werden.

5. Feststellung der Fällbarkeit des nun in Lösung befindlichen Proteins durch Säuren oder Alkalien (NH_3), d. h. ob das fragliche Protein von stärker basischem oder stärker saurem Charakter ist. Die Probe ist auch an der genuinen ursprünglichen Eiweißlösung zu prüfen, ist aber erst eindeutig zu verwerten, wenn durch die Methoden der Salzfällungen Gemische von Proteinen getrennt sind. Bei Fällungen ist die Reaktionsveränderung mit Lackmuspapier genau und schrittweise zu kontrollieren und zugleich die Löslichkeit in Säure- oder Alkaliüberschüssen festzustellen.

6. Feststellung über den Schwefel und Phosphorgehalt der durch Salzfällung oder Säure- bezw. Alkalifällung isolierten Substanz. Der Bestimmung muß eine Reinigung durch mehrfach wiederholte Umfällung vorangehen.

7. Feststellung über den Gehalt einer Kohlehydratgruppe oder von Purinbasen in den Hydrolysenlösungen der durch Säuren zerlegten Substanzen. Farbenreaktionen auf Kohlehydratgruppen sind allein nicht entscheidend.

8. Spezialreaktionen durch Fermente (Thrombin, Lab, Pepsin, Trypsin).

Die methodischen Hinweise für die Ausführung dieser acht Aufgaben ergeben sich zum Teil aus den vorangehenden Kapiteln, zum Teil aus den Details der Darstellungen in den folgenden Absätzen und Kapiteln. Die Tabelle soll nur die rasche Identifikation einer Proteingruppe ermöglichen. Alle Spezialreaktionen sind in den deskriptiven Handbüchern der Biochemie aufzufinden.

Wir gehen nun zu der Besprechung der speziellen Darstellungsmethoden der tierischen Proteine über. Aus praktischen Gründen ist das Material zunächst so geordnet, daß erst die Methoden zur biochemischen Aufarbeitung solcher Gewebsflüssigkeiten, Sekrete und Organe behandelt werden, die auf ihren Eiweißgehalt genau analysiert und untersucht sind und deren Proteine das größte praktische Interesse haben.

Die Methoden stellen zum Teil geradezu typische Vorbilder dar, nach denen die Untersuchung jeder proteinhaltigen Lösung vorgenommen werden kann.

I. Die Eiweißkörper des Blutes.

Im Blut kommen folgende Eiweißkörper vor: Serumalbumin, Serumglobuline, Fibrinogen, Fibrinoglobulin, Serumnukleoproteid, Serummukoid.

1. Serumalbumin, vgl. S. 458.

2. Serumglobulin ist der Hauptvertreter der Gruppe der Globuline. Es hat die Eigenschaften dieser Proteinklasse: Unlöslichkeit in Wasser (vgl. unten), Löslichkeit in verdünnten Neutralsalzlösungen und Alkalien, Fällbarkeit durch schwache, verdünnte Säuren, Löslichkeit im Säureüberschuß.

Aus diesen wesentlichsten Eigenschaften ergeben sich die Prinzipien der Serumglobulindarstellung und Reinigung. Man hat zwei Arten der Methoden zu unterscheiden: 1. Die Methode der Säurefällung, 2. die Methoden, welche die zur Lösung des Globulins optimale Salzkonzentrationen nach unten durch starkes Verdünnen, nach oben durch Salzzusätze (Neutralsalze) verschieben.

In der jüngsten Zeit haben sich immer mehr Stimmen erhoben, welche die Einheitlichkeit des von *Pannum* entdeckten Serumglobulins bezweifeln, da man einerseits wässerlösliche Anteile dieses Globulins neben wasserunlöslichen fand, da man ferner durch die Methode der fraktionierten Aussalzung mit Ammonsulfat oder Kaliumazetat Fraktionen von deutlich verschiedenen Fällungsgrenzen und spezifischen biologischen Eigenschaften isolieren konnte. Es soll hier diese Frage nicht kritisch behandelt werden. Wir geben die gebräuchlichen Methoden wieder mit dem Hinweis, daß bei der Kompliziertheit der Verhältnisse ein abschließendes Urteil bis jetzt nicht möglich ist.

A. Darstellung von Globulin aus Blutserum durch Verdünnen oder Ansäuern nach *Hammarsten*[1]).

Frisches, zellfreies Rinderblutserum wird mit der 10- bis 15fachen Menge Wasser verdünnt. Durch Einleiten von CO_2 während ein halb bis zwei Stunden entsteht ein Niederschlag. Statt der CO_2-Fällung kann man vor Verdünnen schon mit verdünnter Essigsäure schwach ansäuern.

Nach 24 Stunden filtriert man vom Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser aus, löst ihn dann in möglichst wenig verdünntem Alkali und fällt erneut mit wenig Essigsäure. Diese Umfällung wird mehrfach wiederholt.

Statt der Reinigung durch Umfällen aus alkalischer Lösung kann man den Niederschlag auch in verdünnter Kochsalzlösung lösen und erneut durch Zusatz von viel Wasser abscheiden.

Der Niederschlag wird dann auf dem Filter salzfrei gewaschen, eventuell durch Alkohol denaturiert und nach Ätherbehandlung getrocknet.

Beurteilung: Die Methode führt in relativ kurzer Zeit und einfacher Weise zu einem Globulinpräparat, das aber nicht frei von Fibrinogen und Fibrinoglobulin ist. Man gewinnt auch nicht die Gesamtmenge des Globulins. *Huiscamp*[2]) hat ferner neuerdings darauf hingewiesen, daß man zwischen einem durch Essigsäure fällbaren Globulin und einem beim Verdünnen ausfallenden Globulin unterscheiden müsse. Das letztere, das Salzglobulin, fällt dann aus, wenn die Serumflüssigkeit einen Salzgehalt von 0·3% enthält, ein Zustand, der durch den Prozeß der Verdünnung erreicht wird. Wenn wirklich beide Körper chemisch verschiedene Substanzen darstellen, so gewinnt man bei der obigen Methode sicher ein Gemisch.

B. Darstellung von Serumglobulin durch Aussalzen mit Neutralsalzen.

1. Fällung mit Magnesiumsulfat nach *Hammarsten*[3]): Man versetzt das neutrale, verdünnte oder unverdünnte Blutserum bei 30° unter tüchtigem Umrühren mit festem, fein

---

[1]) *O. Hammarsten*: Über das Paraglobulin. I. *Pflügers* Arch. **17**. 413 (1878); Über das Paraglobulin. II. Ebenda. **18**. 38 (1878); Über das Fibrinogen. Ebenda. **22**. 431 (1880).

[2]) *W. Huiscamp*: Über die Fällung des Serumglobulins im Blutserum mittels Essigsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 394 (1906).

[3]) *O. Hammarsten*: Über die Anwendung des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**. 467 (1897).

gepulvertem Magnesiumsulfat bis zur Sättigung. Es entsteht eine voluminöse Fällung, die sich nach einiger Zeit abfiltrieren läßt. Der Filterrückstand wird mit gesättigter, neutraler Magnesiumsulfatlösung gewaschen, durch Wasserzusatz gelöst und erneut in der beschriebenen Weise mit Mg SO_4 gefällt. Der abfiltrierte Rückstand kann in Wasser gelöst und durch Dialyse salzfrei gefällt werden.

B e u r t e i l u n g. Die Abtrennung der Globuline von dem Serumalbumin ist auf diese Weise eine vollständige. Wenigstens findet sich im Filtrat des Mg SO_4-Niederschlages kein Protein von Globulineigenschaften.

Der Niederschlag enthält Fibrinogen und Fibrinoglobulin, von denen er, wenn es sich um eine Reindarstellung handelt, getrennt werden muß. Bei der Salzbefreiung durch Dialyse bleibt ein Teil des Globulins gelöst, der ausfallende Teil wird bei längerer Berührung mit Wasser auch in verdünnten Salzlösungen unlöslich. Ob man mit *Burckhardt* oder *Howell* an der Identität des gesamten Magnesiumsulfatniederschlages mit dem Globulin zweifelt, hängt lediglich davon ab, ob man für die Definition eines Globulins die alten klassischen Eigenschaften desselben verwertet oder den ganzen Globulinbegriff n e u umschreibt.

2. F ä l l u n g m i t A m m o n i u m s u l f a t [*Kauder*[1]), *Pohl*[2])]: Man versetzt das verdünnte oder unverdünnte, schwach alkalische Blutserum mit dem gleichen Volumen einer neutralen, gesättigten Lösung von Ammonsulfat. (Die ersten Zusätze erzeugen noch keine Fällung, da die untere Sättigungsgrenze des Globulins bei 24%iger Salzsättigung liegt.) Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und mit einer halbgesättigten Lösung von Ammonsulfat gewaschen. Zur Reinigung wird in Wasser oder Kochsalzlösung gelöst und erneut unter Halbsättigung der Lösung mit Ammonsalz gefällt. Diese Prozedur wird ein drittes Mal wiederholt; der letzte Niederschlag wird auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis das Filtrat keine oder nur angedeutete Biuretreaktion gibt. Dann wird scharf abgepreßt und 24 Stunden lang dialysiert. Der durch abgeschiedenes Globulin getrübte Schlauchinhalt wird mit einer überschüssigen Menge Alkohol versetzt und dann filtriert. Der Filterrückstand bleibt längere Zeit mit Alkohol in Kontakt, wird dann mit Äther nachgewaschen und getrocknet. Der resultierende denaturierte Körper stellt die G e s a m t h e i t d e r S e r u m g l o b u l i n e dar.

---

[1]) *G. Kauder*: Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Arch. f. exper. Pharm. **20**. 411 (1886).

[2]) *J. Pohl*: Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. experim. Pharm. **20**. 426 (1886).

Beurteilung. Die Methode führt zu einer quantitativen Trennung der Globuline von dem Serumalbumin. Die Fällung mit Ammonsulfat ist daher zur Methode quantitativer Globulinbestimmung in allen eiweißhaltigen Flüssigkeiten verwertbar (siehe Harn, Serumtrans- und -exsudate). Der niedergeschlagene Körper stellt aber ein Rohprodukt dar, da er das Fibrinogen und Fibrinoglobulin enthält.

Darstellung von fibrinogenfreiem Serumglobulin (*Reye*[1]).

Man versetzt je 2 Teile unverdünntes Serum mit 5 Teilen Wasser und 3 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung. Es entsteht eine Fällung, welche neben etwas Globulin das Fibrinogen und Fibrinoglobulin enthält. Man filtriert ab und setzt nun zu dem Filtrat so viel der Ammonsalzlösung, daß eine nahezu halbgesättigte Lösung entsteht. Der nun entstehende Serumglobulinniederschlag wird wie vorangehend beschrieben behandelt und gereinigt. Auch diese Methode ist zur quantitativen Bestimmung von Fibrinogen neben Serumglobulin und Serumalbumin im Blutserum verwertbar (vgl. Blutserum). Die Trennung der Fibrinogene von Globulin durch fraktionierte Koagulation führt nicht zu sauberer Trennung.

3. Die Fällung des Serumglobulins mit Kaliumazetat bietet vor der Fällung mit Ammonsulfat keine Vorzüge[2]).

Versuche, das Globulin in Einzelfraktionen zu zerlegen:

a) Trennung in wasserlösliches und wasserunlösliches Globulin durch Dialyse. Man verwendet die salzhaltige Lösung eines nach *Hammarsten* oder *Kauder* dargestellten Globulins. Dasselbe wird in Wasser, wenn nötig in einer Kochsalzlösung gelöst und der Dialyse unterworfen. Es scheidet sich ein Globulin als unlöslicher Körper aus, ein zweites Globulin bleibt in Lösung. Dasselbe kann durch eine der genannten Methoden aus seiner Lösung ohne Denaturierung dargestellt oder denaturiert durch Alkoholzusatz gefällt werden (*Marcus*[3]).

b) Trennung durch fraktionierte Salzfällung in Euglobulin und Pseudoglobulin aus Serum oder Globulinlösungen (*Spiro* und

---

[1]) *W. Reye*: Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaug.-Diss. Straßburg 1898.

[2]) *S. Wallerstein*: Quantitative Bestimmung der Globuline im Blutserum und in tierischen Flüssigkeiten. Inaug.-Diss. Straßburg 1902.

[3]) *E. Marcus*: Über ein wasserlösliches Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 559 (1899).

Fuld[1]). Man bringt das Serum auf eine Sättigung von 24% Ammonsulfat und filtriert von dem Fibrinoglobulin ab. Das Filtrat wird auf eine Sättigung von 33% Ammonsulfat gebracht (Zufügen vom halben Volumen der vorhandenen Eiweißlösung). Der sich abscheidende Niederschlag stellt das Euglobulin dar. Man filtriert ab und reinigt durch Umfällen usw. in der beschriebenen Weise. Das Filtrat des Euglobulins scheidet oberhalb einer jetzt steigenden Sättigung von 34% Salz einen neuen Körper ab, dessen Sättigung mit 46% (also durch Zufügen von einem Drittel Volumen gesättigter Salzlösung zum jetzt vorhandenen Volumen der Salzglobulinlösung) beendet ist. Er stellt das Pseudoglobulin dar. Die Reinigung erfolgt in gleicher Weise.

Die Fraktionierung von Euglobulin und Pseudoglobulin durch Halbsättigung mit Kaliumazetat bietet keine Vorteile vor der Verwendung von Ammonsulfat.

c) Kombination der Salzfällung und Dialyse nach *Freund* und *Joachim*[2]). Man trennt in der nach 2. beschriebenen Weise in Eu- und Pseudoglobulin. Beide Niederschläge werden in Wasser gelöst, zweckmäßig zu der ursprünglichen Konzentration der Ausgangslösung an Eiweiß und zwei- bis dreimal durch Fällen mit $Am_2\,SO_4$ und Lösen in Wasser gereinigt. Die Pseudoglobulinlösung wird vor der weiteren Verarbeitung durch ein Drittel $Am_2\,SO_4$-Sättigung noch einmal auf Euglobulinbeimengungen geprüft und, wenn nötig, durch Filtration davon befreit.

Beide Lösungen (Euglobulin = I, Pseudoglobulin = II) werden nun vier bis sechs Wochen lang der Dialyse gegen strömendes Wasser unterworfen. In I und II kommt es zur Abscheidung eines unlöslichen Globulins, während ein zweiter Globulinanteil in Lösung bleibt.

Es wird vom Ungelösten abfiltriert. Der Filterrückstand wird bis zum Ablaufen abiureter Waschflüssigkeiten gewaschen, danach so lange mit 0·6%iger Kochsalzlösung extrahiert, als noch Eiweiß in Lösung geht. Bei dem unlöslichen Globulin von I und II bleibt ein Teil in Kochsalz ungelöst; derselbe wird aber durch 0·25%ige $Na_2\,CO_3$-Lösung gelöst.

Beurteilung: Inwieweit bei der letzten Fraktionierungsmethode sekundäre Veränderungen nur eine Vielheit spezifischer Globuline vortäuschen oder wirklich chemisch differente Individuen vorliegen, entzieht sich vorläufig der sicheren Beurteilung (*Taylor*)[3]).

---

[1]) *E. Fuld* und *K. Spiro*: Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 407 (1902).

[2]) *E. Freund* und *J. Joachim*: Zur Kenntnis der Serumglobuline. Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**. 407 (1902).

[3]) *Henry Cobden Haslam*: Trennung von Proteinen. Biochem. Journ. **7**. 492 (1913).

Einige Eigenschaften der Serumglobuline und ihrer Einzelfraktionen:

Die mittlere Zusammensetzung eines nach *Hammarsten* dargestellten Globulins beträgt C 52·71, H 7·01, N 15·85, S 1·11%, nach *Mörner* 1·02% S und 0·67% bleischwärzender Schwefel. Koagulationstemperatur in 10%iger Na Cl-Lösung 69 bis 76°, meist 75°. $(\alpha)_D = -47{\cdot}8°$.

Eine Beteiligung eines Kohlehydrates am Aufbau des Serumglobulins, die wiederholt behauptet wurde, scheint nicht zu existieren. Reduzierende Substanzen, die unter den Produkten der Säure- oder Barytspaltung gefunden wurden, dürften Verunreinigungen entstammen.

Euglobulin fällt bei Halbsättigung seiner Lösung mit Kaliumazetat und ist durch Essigsäure und Dialyse fällbar (*Spiro*).

Pseudoglobulin zeigt diese drei Eigenschaften nicht.

Außer diesen beiden Fraktionen haben *Spiro* und *Porges*[1]) durch Ammonsulfatfraktionierung ein drittes Globulin bestimmt, so daß sich für sehr verdünnte Lösungen des Globulins die folgenden Fällungsgrenzen mit Ammonsulfat ergeben und die folgenden Globuline ausfallen:

	C	H	N	S	$(\alpha)_D$	
30 bis 37% Sättigung	52·68	7·65	16·03	1·13	49°	Koag.-Temp. in 5%iger Am_2SO_4-Lös. 70—75°.
37 „ 44% „	50·48	7·78	15·5	0·98	41°	
44 „ 50% „	47·52	8·14	14·4	0·92	42°	

Qualitativer Nachweis eines Globulins.

Man fällt das Globulin aus der zu prüfenden eiweißhaltigen Lösung durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und in wenig Wasser gelöst. Man bestimmt den Koagulationspunkt der Lösung. Temperaturen zwischen 65 bis 76° zeigen die Gegenwart eines Globulins an. Trübungen, die bei 55° entstehen, entstammen dem Fibrinogen.

Eine andere Probe der fraglichen Eiweißlösung wird dialysiert. Ein Niederschlag, der in verdünnten Salzlösungen löslich und durch Verdünnen und Ansäuern fällbar ist, beweist die Anwesenheit eines Globulins.

Über Nachweis und die quantitative Bestimmung siehe bei den Organ- und Körperflüssigkeiten.

[1]) *O. Porges* und *C. Spiro*: Die Globuline des Blutserums. *Hofmeisters* Beitr. **3**. 277 (1902).

3. Fibrinogen ist ein Protein mit Globulineigenschaften, das durch die Wirkung eines Fibrinfermentes in Fibrin übergeht.

Reindarstellung aus Blutserum nach *Hammarsten*[1]) [das klassische Verfahren hat durch *Heubner*[2]) einige Ergänzungen erfahren].

Mehrere Liter des frischen, durch Zusatz von 0·3 bis 1% Kaliumoxalat oder 0·2 bis 0·3% Ammoniumoxalat ungerinnbar gemachten Pferdeblutes werden scharf abzentrifugiert. Das Oxalatplasma bleibt über Nacht bei kühler Temperatur (Kühlraum oder Eisschrank) stehen und wird nach 24 Stunden durch Abhebern und Zentrifugieren von Zellresten und einem sich beim Stehen abscheidenden, profermenthaltigen Niederschlag getrennt. (Das Absetzen dieses Niederschlages ist abzuwarten, da sonst keine profermentfreien Lösungen entstehen!) Unter Umständen kann das frische Oxalatblut auch sofort durch ein- bis zweistündiges Zentrifugieren von körperlichen Elementen befreit werden.

Das filtrierte, stark alkalisch reagierende Pferdeblutplasma wird (frühestens drei bis vier Stunden nach der Blutentnahme) vollständig mit kalkfreiem Kochsalz gesättigt. Das hiebei ausfallende Globulin- und Fibrinogengemisch steigt an die Oberfläche und wird abfiltriert. Es wird alsdann in wenig 5%iger Kochsalzlösung gelöst und mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzt (Halbsättigung). Der entstehende Niederschlag besteht aus Rohfibrinogen. *Heubner* empfiehlt bei der Halbsättigung eine strenge Kontrolle des Salzgehaltes mit Hilfe des Aräometers vorzunehmen, um einen Überschuß von Kochsalz zu vermeiden. Ein Zuwenig an fällendem Salz ist unschädlich. Der Niederschlag wird dekantiert, filtriert und mit Filtrierpapier abgepreßt, alsdann in einer 5- bis 8%igen Kochsalzlösung gelöst und durch Halbsättigung mit Kochsalz erneut gefällt. Diese Umfällung wird dreibis viermal in gleicher Weise wiederholt, so daß das Filtrat der letzten Fällung nahezu eiweißfrei ist.

Die zuletzt gewonnene Kochsalzfällung wird abfiltriert, gut mit Filterpapier abgepreßt, mit Hilfe der noch anhaftenden Salzreste in wenig Wasser gelöst und gegen ganz schwache Natronlauge zwei Tage bei 0° dialysiert (0·003% Na OH). Es entstehen so etwa 0·9% enthaltende Fibrinogenlösungen, die nahezu salzfrei sind. Die nicht dialysierten Lösungen enthalten 1 bis 2% Fibrinogen neben 1 bis 2% Kochsalz und Spuren Kaliumoxalat.

Zur Hebung der Ausbeute, besonders aber bei Verwendung von Rinderblut ist es zweckmäßig (*Heubner*), die jeweiligen Nieder-

[1]) *O. Hammarsten*: Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgewinnung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 333 (1896).

[2]) *W. Heubner*: Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. **49**. 229 (1903).

schläge der Kochsalzhalbsättigung in der 5%igen Na Cl-Lösung durch Zusatz einer Spur von Na_2CO_3 bei alkalischer Reaktion zu lösen, die erneute Kochsalzfällung aber erst nach genauer Neutralisation dieser Lösungen mit Essigsäure zu vollziehen.

Um das Unlöslichwerden von Fibrinogenanteilen zu vermeiden, darf man die Niederschläge der Salzfällungen nicht unter Wasser stehen lassen.

Aus der nahezu salzfreien Lösung kann das Fibrinogen durch Koagulieren, d. h. Erhitzen auf 58 bis 60° während mehrerer Minuten oder durch Alkoholzusatz denaturiert dargestellt werden.

Zur äußersten Reinigung des Fibrinogens von Fibrinoglobulinbeimischungen wird die salzfreie Fibrinogenlösung mit dem doppelten Volumen einer gesättigten Natriumfluoridlösung gefällt. Der Niederschlag (gallertig bei Pferdefibrinogen, flockig bei Rinderfibrinogen) wird in Wasser, das 0·05% Ammoniak enthält, gelöst. Nach Zusatz von 3 bis 5% Kochsalz kann diese Reinigung durch abermaliges Fällen mit Natriumfluorid wiederholt werden. Aus den NH_3-, Na Cl- und Na Fl-haltigen Lösungen wird das Fibrinogen durch Erhitzen auf 56 bis 58° während fünf Minuten auskoaguliert (*Huiscamp*[1]).

Alle auskoagulierten Fibrinogene werden mit heißem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und schließlich bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Im allgemeinen wird man für praktische Arbeiten nur die Darstellung reiner Lösungen erstreben.

Reindarstellung nach *Reye* (l. c. S. 478, Note 1). Frisches, durch Zusatz von Natriumfluorid (0·56 bis 0·6%) ungerinnbar gemachtes Blut wird durch Zentrifugieren von Blutkörperchen befreit. 12 Teile Plasma werden dann mit 30 Teilen Wasser verdünnt. Diese Verdünnung ist nötig, um für die folgende Salzfällung das Kolloidieren der Fällungsgrenzen von Fibrinogen und Globulin usw. zu verhindern. Zu der verdünnten Lösung fügt man nun 16 Teile einer neutralen gesättigten Ammonsulfatlösung.

Der entstehende, sich bald absetzende Niederschlag wird abfiltriert, eventuell aus 5%iger Na Cl-Lösung in der gleichen Weise mit Am_2SO_4 neu gefällt und schließlich auf dem Filter mit einer entsprechend verdünnten Ammonsulfatlösung (nicht über 28%ig) bis zum Verschwinden der Biuretreaktion im Filtrat gewaschen. Der Filterrückstand, meist ein schneeweißer, fleckiger Niederschlag, wird an der Luft getrocknet, bei 80° koaguliert und mit heißem Wasser nahezu salzfrei gewaschen, schließlich zur Gewichtskonstanz bei 110° getrocknet.

[1]) *W. Huiscamp*: Zur Fibrinoglobulinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**. 182 (1904).



B e u r t e i l u n g: Zur Darstellung ist die alte Methode nach *Hammarsten* vorzuziehen. Zur quantitativen Bestimmung relativer Fibrinogenmengen hat sich die Methode von *Reye* bewährt.

D a r s t e l l u n g v o n F i b r i n o g e n n a c h *W. Huiscamp*[1]).

Das Pferdeblut wird in 1%igem Kaliumoxalat aufgefangen und etwa eine halbe Stunde nach der Blutentnahme zentrifugiert. Das noch nicht ganz klare Plasma wird abgehebert und nach zwei bis zweieinhalb Stunden abermals zentrifugiert. Wichtig ist, daß die Berührung von Plasma und Formelementen des Blutes nur kurze Zeit andauert. Das klare Plasma wird nun mit dem gleichen Volumen gesättigter, kalkfreier Kochsalzlösung versetzt. Der entstehende, gallertige Niederschlag wird durch Zentrifugieren während 15 Minuten zusammengeballt, mit dem Glasstab herausgenommen und mit Filtrierpapier abgepreßt. Nach möglichster Befreiung von Flüssigkeit wird er in Wasser gelöst. Die ihm noch beigemengten Salzmengen genügen zur Lösung. In der neuen Lösung wird die Fällung durch Halbsättigung mit Kochsalz wiederholt. Der jetzt entstehende Niederschlag setzt sich sofort zäh am Boden ab. Man preßt ihn in wenigen Augenblicken am Boden des Gefäßes zusammen, nimmt ihn dann heraus und löst ihn abermals ohne Verlust in Wasser. Auch diese Prozedur wird wiederholt. Schließlich resultiert eine bläuliche, opaleszierende Lösung von reinem Fibrinogen.

Was die A u s b e u t e n an Fibrinogen betrifft, so kann man bei schnellem Arbeiten und bei der Verwendung großer Blutplasmamengen zu etwa 1%igen Fibrinogenlösungen gelangen. Die Ausbeute nimmt erheblich mit der Reinigung ab, so daß die Lösungen oft auf einen Gehalt von 0·1 bis 0·3% Fibrinogen herabsinken und selbst dabei noch 3 bis 5% Na Cl als Asche enthalten. Natürlich ist auch die Reinheit von der Natur des Ausgangsmaterials abhängig. Fibrinogen aus Transsudaten ist bisher wohl noch kaum ganz lezithinfrei dargestellt worden.

E i g e n s c h a f t e n. Fibrinogen hat die allgemeinen Eigenschaften der Globuline. Es ist in feuchtem Zustand elastisch, zäh, klumpig zusammenballend. Lösungsmittel sind verdünnte Salzlösungen und Alkalien. Fällungsmittel sind u. a. Kohlensäure und verdünnte Säuren sowie Neutralsalze. Die Fällung durch Magnesiumsulfat und Kochsalz ist schon vor Halbsättigung beendet. Die untere Fällungsgrenze des im Plasma gelösten Fibrinogens gegen gesättigte Ammonsulfatlösung beträgt 1·5 bis 1·7, die obere Sättigungsgrenze 2·5 bis 2·7 bei Fällung von 2 cm^3 Blutplasma in

[1]) *W. Huiscamp*: Bemerkungen zur Fibrinoglobulinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 273 (1905).

dem Gesamtvolum von 10 *cm*³ Flüssigkeit (Plasma + Wasser + gesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung).

Kalziumchlorid erzeugt in ganz schwach alkalischer, salzfreier Lösung einen Niederschlag, der in Salzen und im Überschuß des Kalksalzes löslich ist.

R e i n e Fibrinogenlösungen gerinnen nicht spontan, sondern bleiben tagelang flüssig. Die Koagulationstemperatur liegt bei einem Kochsalzgehalt der Lösung von 5 bis 10% bei 52 bis 55°, bei einem Salzgehalt unter 2% bei 56°.

Quantitativ wird es auskoaguliert durch Erwärmen auf 58° während fünf Minuten. Ein Fibrinogen aus Krebsblut koaguliert bei 65°.

$(\alpha)_D = -52{\cdot}5$ für Pferdefibrinogen, $(\alpha)_D = -36{\cdot}8$ für Rinderfibrinogen. Als mittlere Zusammensetzung wird angegeben: C 52·93, H 69, N 16·66, S 1·25, O 22·26%. Der Schwefelgehalt beträgt nach *Mörner* 1·13% mit 0·46% leicht abspaltbarem Schwefel.

V o r k o m m e n. Fibrinogen findet sich: im Blutplasma, Blutserum, auch niederer Tiere, der Chyluslymphe, in einigen Trans- und Exsudaten, im Knochenmark, in lymphoiden Organen und in der Vesicula seminalis des Meerschweinchens.

Q u a l i t a t i v e r N a c h w e i s. Auf das Vorhandensein von Fibrinogen kann überall da geschlossen werden, wo Spontangerinnungen von tierischen Gewebsflüssigkeiten vorkommen oder wo solche Gerinnungen durch Zusatz von Fibrinferment oder fermenthaltiger Flüssigkeit (frisches Blutserum) zu erzielen sind. Nur die Spontangerinnung von myosinhaltigen Flüssigkeiten kann zu Verwechslungen führen. Für Fibrinogen entscheidet der Fermentversuch und die Koagulationstemperatur[1]).

Q u a l i t a t i v e P r o b e d u r c h F i b r i n f e r m e n t w i r k u n g.

Man prüft zweckmäßig so, daß man eine Probe der Gewebsflüssigkeit oder eines Organextraktes in physiologischer Kochsalzlösung der Spontangerinnung überläßt und zu einer anderen Probe eine aliquote Menge frischen, vom Fibrin durch Schlagen befreiten und filtrierten Blutserums setzt (siehe unten). Die Proben werden bei 35° während zwölf Stunden belassen und nachher auf das Vorhandensein von Fibrin geprüft.

Zur Ausführung dieser an sich wenig sicheren Probe ist die Anwendung größerer Mengen Gewebsflüssigkeit (bis zu 100 *cm*³) nötig.

[1]) Vgl. dazu *A. Perutz* und *M. Rosemann*: Über eine biologische Methode zur direkten Bestimmung des Fibrinogens im Blute. Biochem. Zeitschr. **90**. 53 (1918).

Nach *Piettre* und *Vila*[1]) kann Fibrinogen auch in folgender Weise gewonnen werden: Man dialysiert das nach *Hammarsten* erhaltene Salzplasma zirka 24 Stunden in Kollodiumsäcken gegen Zuckersirup vom spezifischen Gewicht 1·380, sodann gegen destilliertes Wasser. Im Verlaufe der zweiten Dialyse setzt sich das Fibrinogen als weiße Masse ab; aus 1 *l* Pferdeblut wurden so 4·69 *g* Fibrinogen erhalten.

Eine zweite Probe liegt in der Prüfung der Koagulationstemperatur. Das Auftreten einer Trübung in der Lösung bei 52 bis 55° spricht für das Vorhandensein von Fibrinogen. In nicht zu komplizierten Eiweißgemischen ist die Probe verwertbar, natürlich unter Anwendung aller Kautelen, die einer Koagulationstemperaturbestimmung die Objektivität garantieren (siehe hiezu S. 463).

Die Methode der Darstellung nach *Reye* gestattet auch den Fibrinogennachweis im Blutserum.

4. Fibrin ist ein wasserunlösliches Umwandlungsprodukt des Fibrinogens und entsteht aus diesem unter dem Einfluß des Fibrinfermentes.

Darstellung von Rohfibrin aus Blutplasma Als Ausgangsmaterial wählt man große Mengen frischen Pferdeblutes. Für die Isolierung möglichst zellfreien, reinen Fibrins empfiehlt sich die Verarbeitung von fibrinogenhaltigen Transsudaten oder von Oxalatplasma, aus dem man die Oxalsäure mit Ca-Salzen entfernt. Während des Gerinnungsprozesses werden größere Mengen frisch aufgefangenen Blutes mit einem rauhen Holzstabe, Fischbeinstäben oder einem Drahthaarpinsel energisch geschlagen. Das Fibrin scheidet sich dabei als fadige, elastische Strähne ab. Mit der Fortdauer dieser Prozedur wird es immer fester und kohärenter. Schließlich entfernt man die Fibrinmassen, die sich um das Instrument, mit dem man das Schlagen bewirkt hat, aufgewickelt haben, manuell und extrahiert sie unter häufigem Umrühren und Durchkneten tagelang mit großen Mengen häufig erneuerten Wassers. Mit zunehmender Reinigung und Entfärbung wird das Fibrin schneeweiß, verliert aber unter Quellung erheblich an Elastizität. Der ersten Extraktion mit Wasser läßt man eine Extraktion mit physiologischer und mit 10%iger Kochsalzlösung folgen. Hierauf extrahiert man abermals mit Wasser und schließlich drei Tage lang mit 0·02% Ammoniak (zur Befreiung von Fibrinoglobulin!). Die ganze Fibrindarstellung muß bei niederer Temperatur vorgenommen werden, um Fäulnisprozesse zu vermeiden.

Für Verdauungsversuche kann man das Rohprodukt des Fibrins verwenden. Zum Zweck der Reindarstellung aber müssen

[1]) *Piettre* und *A. Vila*: Darstellung von Fibrinogen durch Dialyse gegen Zuckersirup. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **156**. 1182 (1913).



alle Extraktionen peinlich durchgeführt werden. Zuletzt denaturiert man durch Behandeln mit Alkohol oder durch Erhitzen auf 75°, wodurch das Fibrin an Dehnbarkeit und Diaphanität seiner Farbe verliert. Man verdrängt zuletzt den Alkohol mit Äther und trocknet im Vakuum.

Reindarstellung kleiner Fibrinmengen nach *Heubner* (l. c. S. 364, Note 3). Man fängt das Pferdeblut in so viel Kochsalzlösung auf, daß eine Lösung von 60% Blutplasma mit 4% Kochsalz entsteht. Alsdann werden die Blutkörperchen durch energisches Zentrifugieren beseitigt. Man verdünnt nun mit Wasser derart, daß ein Gerinnungsoptimum hergestellt wird. Alsdann versetzt man die Lösung mit so viel Ammoniak, daß die Lösung einen NH_3-Gehalt von 0·0014% gewinnt und rührt das Ganze sofort mit dem mechanischen Rührer im kalten Kellerraum durch. Nach 48 Stunden ist die Gerinnung beendet. Die Fibrinfäden finden sich um das Rührwerk gewickelt, von dem sie leicht mechanisch entfernt werden können. Sie werden hierauf fein zerschnitten, mit 10%iger Kochsalzlösung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen, mit Wasser salzarm gewaschen und bei 110° getrocknet.

Ebenso reines Fibrin läßt sich natürlich durch Zusatz von Fibrinferment oder fermenthaltigem Material zu den oben beschriebenen Fibrinogenlösungen darstellen. Es scheidet sich dann das Fibrin in feinen Fäden ab, die sich leicht am Glasstab fixieren lassen und dann kurz mit verdünnter Na Cl-Lösung oder direkt mit heißem Wasser und Alkohol und Äther behandelt werden.

Beurteilung: Keine der eben genannten Isolierungsmethoden garantiert die Gewinnung eines unveränderten Fibrins im strengsten chemischen Sinne. Die ausgedehnten Extraktionen zur Befreiung von morphologischen Elementen oder von Fermenten bedingen zumeist eine partielle Denaturierung des Fibrins oder eine Spaltung, sind also nicht absolut indifferent.

Eigenschaften. Fibrin steht in seinen Löslichkeitsverhältnissen den koagulierten Eiweißkörpern sehr nahe, unterscheidet sich aber von ihnen durch seine relativ leichte Veränderlichkeit durch Salzlösungen. Die Eigenschaften der Elastizität und des physikalischen Verhaltens sind von dem Aggregatzustand, d. h. von seiner Dichte außerordentlich abhängig. Mit Salzbehandlung oder Alkoholbehandlung geht die Elastizität unter gleichzeitiger Schrumpfung verloren, im Kontakt mit Wasser kehrt sie partiell unter Quellung wieder. In H Cl oder Na OH quillt Fibrin gallertig auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Änderung der äußeren physikalischen Eigenschaften die Begleit- oder Folgeerscheinung einer chemisch molekularen Veränderung des Fibrins ist.

Mittlere Elementarzusammensetzung: C 52·68, H 6·83, N 16·91, S 1·10%. Koagulationstemperatur 75°.

Nach *Bosworth*[1]) zeigt aus frischem Ochsenblut dargestelltes und durch wiederholte Umfällung aus Na OH durch Essigsäure gereinigtes Fibrin, auf Trockensubstanz berechnet (1·8% Feuchtigkeit), folgende Zahlen: C 51·8, H 6·9, N 17·2, S 0·95.

Das Fibrin verbindet sich mit Säuren und Basen; es ist aus Lösungen in Alkali durch CO_2 nicht fällbar; aus Ca- und Ba-Fibrinatlösungen fallen durch CO_2 saure Fibrinate.

Qualitativer Nachweis. Niederschläge in Gestalt von Fetzen oder Flocken, die in Gewebsflüssigkeiten vorkommen, werden durch Aufschlemmen in Wasser und Waschen mit 5- bis 10%iger thymolisierter Kochsalzlösung von anderen Proteinen befreit. Man prüft dann das Verhalten gegen 0·1% Salzsäure (Quellung!) oder die leichte Verdaulichkeit durch Pepsinsalzsäure (Magensaft). In der Wärme geht der Körper zum Teil in eine Lösung, welche die Eiweißfarbenreaktionen gibt, über.

5. Fibrinoglobulin galt bald als ein im Blutplasma präformiertes Globulin, bald als ein aus dem Fibrinogen beim Übergang in Fibrin neben diesem entstehendes Protein (*Schmiedeberg*, *Heubner*). Mit allergrößter Wahrscheinlichkeit besteht die erstgenannte Auffassung zurecht (vgl. l. c. S. 364, Note 3, S. 365, Note 1 und S. 366, Note 1).

Das Fibrinoglobulin findet sich im Serum. Wegen seiner gleichen Eigenschaften gegen die fällende Wirkung von Kochsalz ist in allen nach *Hammarsten* aus Blutplasma bereiteten Fibrinogenlösungen das gesamte Fibrinoglobulin des Plasmas enthalten. Die Trennung beider Körper mit Hilfe der Fällung durch Natriumfluorid (vgl. bei Fibrinogen) gelingt nur insofern, als man globulinfreies Fibrinogen darstellen kann, aber kein fibrinogenfreies Globulin, da die Fällung des Fibrinogens mit Na F keine quantitative ist.

Darstellung von Fibrinoglobulin aus Fibrinogenlösungen nach *Hammarsten*[2]). Man löst das genuine Fibrinogen in verdünnter Kochsalzlösung und bringt dasselbe durch Zusatz von Ferment oder fermenthaltiger Lösung oder auch durch partielles Erwärmen auf 56° als Fibrin- bezw. Fibrinogenkoagulat zur Ausfällung. Das Filtrat dieses Niederschlages enthält das Fibrinoglobulin, das man entweder durch weiteres Erhitzen der Lösung auf 64° in denaturierter oder durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz in genuiner Form zur Abscheidung bringt. Statt Kochsalz kann man auch Ammonsulfat verwenden. Die

[1]) *A. W. Bosworth*: Fibrin. Journ. of Biol. Chem. **20**. 91 (1915).

[2]) *O. Hammarsten*: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fibrinbildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 98 (1899); Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 333 (1896). Ferner *Malys* Jahrb. 1882, S. 11.

Fällungsgrenze des Fibrinoglobulins liegt bei 28% Salzsättigung. Die Fällung wird in der für Globuline üblichen Weise gereinigt (Umfällung, Dialyse, Alkoholfällung).

Die Darstellung aus spontan von Fibrinogen befreiten Lösungen, d. h. aus Blutserum, erfolgt in ganz derselben, eben beschriebenen Weise.

Die Elementaranalyse ergab die Werte: C 52·70, H 6·98, N 16·06%. Koagulationstemperatur 64 bis 66°.

Der qualitative Nachweis ergibt sich aus den hier geschilderten Darstellungsmethoden. Die Koagulationstemperatur von 64 bis 66° ist für das fibrinogenfreie Fibrinoglobulin charakteristisch, natürlich nur dann, wenn die in Frage kommende Eiweißlösung frei von Muskeleiweißkörpern ist. Da aber Fibrinoglobulin stets neben Fibrinogen vorkommt, so überzeugt man sich zuerst von der Anwesenheit des letzteren durch einen Fermentversuch mit reinem Fibrinferment.

6. Nukleoproteid aus Blutserum.

Ein von *Pekelharing* im Rinderblutserum entdecktes Nukleoproteid wird heute zweckmäßig nach Angaben von *Huiscamp*[1]) oder von *Liebermeister*[2]) isoliert. Der Körper scheint mit einem Proteid identisch, das *Freund* und *Joachim* (l. c. S. 361, Note 1) bei der Aufteilung der Serumglobuline von Mensch, Pferd und Rind fanden und als Nukleoproteid bezeichnen (vgl. hiezu Serumglobulin, S. 475 ff.).

Zur Darstellung dieses Körpers müssen große Mengen Serum verwendet werden, da derselbe normalerweise höchstens zu 0·15 bis 0·2‰ in ihm enthalten ist.

1 Volumen Rinderblutserum wird mit 2 Volumen Wasser verdünnt und alsdann mit verdünnter Essigsäure bis zu deutlich saurer Reaktion versetzt. Der entstehende flockige Niederschlag, bestehend aus Globulin und Nukleoproteid, wird nach dem Absetzen dekantiert und auf ein Filter gebracht. Alsdann wird der Filterrückstand mit möglichst wenig Ammoniak in Wasser gelöst. Nach dem Filtrieren dieser das Proteid enthaltenden Lösung wird durch Zusatz einer Lösung von Kalziumchlorid eine Fällung erzeugt. Der entstehende Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, mit Wasser nach Zusatz von zwei Tropfen Ammoniak gelöst, filtriert und nochmals mit Kalziumchlorid gefällt. Der jetzt entstehende Niederschlag wird auf dem Filter mit Alkohol so lange gewaschen,

[1]) *W. Huiscamp*: Über die Eiweißkörper der Thymusdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 191 (1901).

[2]) *G. Liebermeister*: Über das Nukleoproteid des Blutserums. *Hofmeisters* Beitr. **8**. 439 (1906).



bis der abfließende Waschalkohol kein Kalziumchlorid mehr enthält. Hierauf bringt man den Niederschlag unter Äther und läßt ihn schließlich lufttrocken werden.

Das so dargestellte Proteid enthält 1·853% Asche, 0·639% Kalk und nur wenig Phosphor.

Ob der Körper ganz rein von Globulinbeimischungen darstellbar ist, bleibt zweifelhaft. Er ist wie durch $CaCl_2$ auch durch $BaCl_2$ und $MgSO_4$ fällbar. Im Überschuß des $CaCl_2$ ist er nicht ganz unlöslich, daher ist bei der Fällung mit diesem Salz ein Überschuß zu vermeiden.

Methode nach *Liebermeister*[1]).

Je 1 *l* Pferdeblutserum wird mit 20 *l* Wasser verdünnt. In diese Lösung wird Kohlensäure eingeleitet. Es entsteht eine Trübung, die sich bald zu Boden setzt. Sie besteht aus Euglobulin und dem gesuchten Nukleoproteid. Man hebert die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit ab, zentrifugiert den feuchten Niederschlag in flachen Zentrifugiergläsern scharf ab. Nun setzt man zu dem am Boden des Gefäßes befindlichen Niederschlag vorsichtig die fünffache Menge einer 1%igen Kochsalzlösung unter Überschichtung zu und läßt ruhig stehen. Meist nach sechs Stunden ist der größte Teil des Niederschlages (das Globulin) in Lösung gegangen. Nach vorsichtigem Abgießen dieser Lösung hinterbleibt ein glasiger, schleimiger fadenziehender Bodensatz. Dieser wird in 1%iger Kochsalzlösung nach Zusatz einer ausreichenden Spur von Natriumkarbonat gelöst und aus der Sodalösung mit wenig verdünnter Essigsäure gefällt. Nach einigem Stehen wird der flockige Niederschlag abfiltriert, auf dem Filter durch Übergießen mit absolutem Alkohol koaguliert und schließlich mit heißem Wasser gewaschen. Nachdem der Filterrückstand lufttrocken ist, wird er im *Soxhlet*-apparat zur Befreiung von Fett und Cholesterin zwölf Stunden lang mit Alkohol und mehrere Tage mit Äther extrahiert. Die Behandlung mit Äther ist so lange fortzusetzen, bis eine Probe des Ätherextraktes keinen phosphorhaltigen Rückstand mehr hinterläßt. Dann folgt eine zehnstündige Extraktion mit Chloroform und Trocknen bei 100°.

Die Ausbeuten betragen etwa 2·5 *g* aus 15 *l* normalem Blutserum des Pferdes. In pathologischen Fällen (septische Eiterungen) kann die Ausbeute auf 2‰ steigen. Die krankhaften Vermehrungen des Proteidgehaltes sind noch nicht eingehend studiert worden.

Eigenschaften: Der Körper hat im allgemeinen die Eigenschaften eines Nukleoproteides. Er ist löslich in Soda und

[1]) *G. Liebermeister*: Über das Nukleoproteid des Blutserums. *Hofmeisters* Beitr. **8.** 439 (1906).



fixen Alkalien sowie in einem großen Überschuß von Essigsäure. Er ist unlöslich in Wasser, 1%iger Kochsalzlösung und verdünnter Essigsäure. Seine Zugehörigekeit zu dieser Gruppe der Proteide ist weniger durch seinen relativ niederen Phosphorgehalt, als durch den Gehalt von Nuklein- bezw. Purinkörpern bewiesen. Diese werden durch Behandeln mit kochender 10%iger Salzsäure während vier Stunden abgespalten und sind mit ammoniakalischer Silbernitratlösung fällbar.

Von den Eiweißfarbenreaktionen fehlt die Reaktion nach *Hopkins-Adamkiewicz*. Die mittlere Elementarzusammensetzung wurde gefunden zu:

C 51·65, H 7·24, N 13·88, P 0·079, S etwa 1·0, Asche 0·33%.

Das Nukleoproteid im Blutplasmaniederschlag (*Bang*[1]).

Man zentrifugiert Blut (am besten Pferdeblut), dem man 0·3% Ammoniumoxalat zugesetzt hat. Das Plasma wird abgetrennt und filtriert. Nach 48stündigem Stehen im Eisschrank hat sich ein Niederschlag gebildet, der durch Zentrifugieren gesammelt wird. Man löst denselben nach Möglichkeit in Wasser — ein Teil bleibt ungelöst —, filtriert und gewinnt durch Zusatz von $Ca\,Cl_2$ oder wenig verdünnter Essigsäure eine reichliche Fällung. Dieser entstehende Säureniederschlag wird abzentrifugiert, in wenig 0·01%iger Natronlauge gelöst. Die meist zuerst schleimige Lösung wird nach einiger Zeit klar und dann flüssig unter Zusammenballen des Niederschlages als Schleimflocken. Diese Flocken wickelt man um einen Glasstab und löst sie in 0·5%iger H Cl. Dabei geht ein Teil durch Spaltung des ursprünglichen Nukleoproteids in ein lösliches Albuminat in Lösung. (Die Identifikation desselben vergleiche bei Thymusproteid.) Inwieweit dieser Körper im Plasma oder Serum präformiert ist, ist nicht entschieden. Jedenfalls dürfte er mit dem Proteid *Liebermeisters* nicht identisch sein. Der beim Stehen ausfallende Niederschlag ist sehr reich an Prothrombin (vgl. hiezu Darstellung von Fibrinogen und Fibrinferment).

7. Serummukoid nach *Zanetti*[2]).

1200 *cm*³ Blutserum vom Rind werden mit 2 Volumen einer 1·5%igen Kochsalzlösung versetzt. Aus dieser Lösung entfernt man das Albumin und Globulin durch Auskoagulieren in der Hitze nach Zusatz der geeigneten Menge Essigsäure (vgl. Kapitel: Ent-

---

[1]) *J. Bang*: Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe. III. Mitt. *Hofmeisters* Beitr. **4**. 362 (1904).

[2]) *C. U. Zanetti*: Über das Ovomukoid und über ein neues Glykoproteid des Blutserums. Ann. di Chim. e di Farm. **26**. 12 (1897); vgl. hiezu auch *H. W. Bywaters*: Über Seromukoid. Biochem. Zeitschr. **15**. 322 (1909).

eiweißung). Das klare Filtrat wird im Vakuum bis auf 45° auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Alkohol gefällt. Der entstehende, etwas gefärbte Niederschlag wird wiederholt auf dem Filter mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bis er nahezu farblos ist. Dann löst man wieder in Wasser und dialysiert die Lösung gegen laufendes und gegen destilliertes Wasser. Das Dialysat engt man wieder auf ein kleines Volumen ein und fällt mit Alkohol. Lösung und Fällung dieser Art werden drei- bis viermal wiederholt. Der zuletzt abfiltrierte Niederschlag wird im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Der resultierende Körper ist ein meist noch gelbliches und leicht hygroskopisches Pulver.

Elementarzusammensetzung C 47·60, H 7·10, N 12·93, S 2·38, Asche 0·3%. (Über die Eigenschaften vgl. Kapitel „Muzinsubstanzen".)

Methoden zur quantitativen Bestimmung der hier genannten Proteine im Blutserum und in anderen serösen und eiweißhaltigen Flüssigkeiten.

Da es sich bei den folgenden Methoden im wesentlichen um die Bestimmung von Globulinen neben Albuminen handelt, so sind die am Blutserum als brauchbar erprobten Methoden auch für andere Proteinlösungen anwendbar, also für Transsudate und Exsudate oder eiweißhaltigen Harn.

1. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes durch direkte Wägung: Man fällt das Eiweiß aus einer abgewogenen oder abgemessenen Blutserum- oder Blutplasmamenge (20 bis 50 cm^3), die durch Zentrifugieren und Filtrieren vollkommen geklärt ist, mit dem vierfachen Volumen Alkohol aus, läßt die Mischung mehrere Stunden stehen und bringt dann den Niederschlag auf ein trocken gewogenes, aschefreies Filter. Auf dem Filter wäscht man mit heißem Alkohol, Äther, dann wieder mit Alkohol und zuletzt mit kochendem Wasser sorgfältig aus. Dieser Filterrückstand enthält die in Wasser bezw. Alkohol unlöslichen Proteine und Salze, bisweilen Spuren von Farbstoffen. Man entfernt die letzten Wasserspuren durch Nachwaschen mit Alkohol und trocknet im Wärmeschrank (Temperatur bis auf 120° gesteigert). Nachdem man gewogen hat, verascht man und zieht die nach der Veraschung verbleibende Aschenmenge von dem Gewicht des Filterrückstandes ab. Der gefundene Wert bezeichnet die Proteinmenge. (Kleine Mengen Proteine gehen nicht selten beim Auswaschen in die wässerig-alkoholische Lösung über, weshalb der hier gefundene Wert etwas zu klein ausfällt.)

Beurteilung: Diese Methode der Alkoholfällung gestattet die Bestimmung auch der unkoagulablen Proteine, also der Mukoide,

Nukleoproteide und einiger Albumosen. Ist man durch qualitative Vorproben darüber orientiert, daß die in Frage kommende eiweißhaltige Lösung, z. B. Harn, albumosenfrei ist, so kann man das Gesamteiweiß auch durch Koagulieren nach einer der auf S. 492 angegebenen Methoden bestimmen.

2. Quantitative Bestimmung der koagulablen Proteine (Albumin + Globulin + Fibrinogen im Serum, Albumin + Globulin im Harn) in serösen Flüssigkeiten. Man erhitzt 50 bis 100 *cm*³ Wasser in einer Porzellanschale oder in einem Becherglas zum gelinden Kochen und läßt aus einer Pipette 15 bis 20 *cm*³ der zu untersuchenden, klar filtrierten Flüssigkeit langsam in die kochende Lösung zufließen. Dann erhält man einige Minuten im Sieden, währenddessen man so lange aus einer Kapillarpipette verdünnte Essigsäure zufließen läßt, bis die Gerinnung grobflockig und die Flüssigkeit klar erscheint. Bei diesem Sieden der Lösung hat man sorgfältig darauf zu achten, daß nicht Koagulate am Boden haften und etwa festkleben und verbrennen können. Man kann, um dies zu vermeiden, den Säurezusatz auch vornehmen, während die Fällungsmischung auf dem kochenden Wasserbad steht. Bisweilen gibt sich der Punkt der quantitativen Ausflockung, d. h. der Punkt des optimalen Säuregehaltes auch daran zu erkennen, daß sich der Niederschlag plötzlich in Form einer gröberen Flockenmasse zu Boden senkt. Man filtriert alsdann noch heiß auf ein trocken gewogenes, aschefreies Filter, indem man zugleich Sorge trägt, daß die Koagulatflocken nirgends am Glas antrocknen können. Gibt das klar ablaufende Filtrat noch eine deutliche Fällung mit Ferrozyankalium und Essigsäure, so ist die Bestimmung zu verwerfen. Man führt dann besser eine neue Bestimmung aus. Ist die Flockung gut gelungen, so muß das Filtrat leicht und wasserklar ablaufen und darf nicht schäumen. Den Filterrückstand wäscht man gut mit heißem Wasser, heißem Alkohol und Äther aus und trocknet zur Gewichtskonstanz bei 120°. Dann verascht man und bringt das Gewicht der Asche von dem Gewicht des getrockneten Niederschlages in Abzug.

Die Bestimmung in serösen Flüssigkeiten geschieht in der gleichen Weise.

3. Quantitative Bestimmung von Albumin und Globulin im Blutserum und in serösen Flüssigkeiten (S. 477, Note 2).

Man mißt oder wiegt 20 bis 50 *cm*³ klarer Flüssigkeit ab und fügt zu derselben das gleiche Volumen einer neutralen, gesättigten Ammonsulfatlösung hinzu. Nach einstündigem Stehen hat sich der gebildete Niederschlag abgesetzt. Längeres Stehenlassen erleichtert die folgende Filtration. Nunmehr filtriert man durch ein aschefreies,

gewogenes Filter quantitativ ab und wäscht den Filterrückstand so lange mit dieser halbgesättigten Ammonsulfatlösung aus, bis eine kleine Probe der abfließenden Flüssigkeit keine Trübung mit Ferrozyankalium + Essigsäure gibt. Der Niederschlag enthält die Globuline und eventuell bei Verarbeitung von Plasma Globuline + Fibrinogen. Das gesamte Filtrat enthält das Albumin.

Aus dem Filtrat fällt man das Albumin, indem man die Lösung zum Sieden erhitzt und mit Essigsäure in der sub 2 beschriebenen Weise fällt. Die Weiterverarbeitung (Filtration, Auswaschen mit heißem Wasser, Entwässern, Trocknen, Wägen, Veraschen, Wägen) geschieht ganz in der dort beschriebenen Weise.

Der Globulinniederschlag wird einige Zeit zur Koagulation auf 110° im Luftbad erhitzt, dann mit kochendem Wasser von Salzen, mit Alkohol von Wasser und mit Wasser von Alkohol befreit. Hierauf trocknet man bei 120° im Luftbad zur Gewichtskonstanz, verascht quantitativ und zieht den gefundenen Aschewert von dem Wert des getrockneten Niederschlages ab.

Führt man diese Bestimmung am eiweißhaltigen Harn aus, so verwendet man 50 bis 100 *cm*³ klar filtrierten Harn, den man vorher mit verdünntem Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzt hat. Im übrigen befolgt man die vorangehenden Vorschriften.

4. Bestimmung von Fibrinogen, Albumin und Globulin im Blutplasma[1]) (l. c. S. 478, Note 1).

Frisch aus dem Gefäß entnommenes Blut läßt man in ein mit 3%iger Fluornatriumlösung beschicktes Gefäß laufen. Man verwendet so viel der Salzlösung, daß eine 0·5 bis 0·6%ige Fluornatriumplasmalösung entsteht. Statt dieses frischen Plasmas kann natürlich auch etwas Oxatplasma verarbeitet werden. 100 *cm*³ des Fluoridplasmas werden mit 25 *cm*³ destilliertem Wasser und 13·4 *cm*³ gesättigter neutraler Ammonsulfatlösung versetzt. Der sich beim Stehen in der Kälte bald abscheidende Fibrinogenniederschlag wird auf ein gewogenes Filter quantitativ abfiltriert (Fibrinogen I). Der Niederschlag wird mit entsprechend verdünnter Ammonsulfatlösung so lange gewaschen, bis das Filtrat auch keine Spur einer Trübung beim Zusatz von Essigsäure + Ferrozyankalium und keine mit Bariumchlorid nachweisbare Schwefelsäure mehr enthält. Der dann mit Alkohol und Äther nachgewaschene Niederschlag wird bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Das Filtrat

[1]) *L. Langstein* und *M. Mayer*: Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutserums bei experimentellen Infektionen. *Hofmeisters* Beitr. **5.** 69 (1904).



des Fibrinogens, mit allen Waschwässern vereinigt, wird nun mit so viel gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, daß das Gesamtvolumen eine Halbsättigung mit Ammonsulfatlösung erhält. (Über die Berechnung bei der Verwandlung einer Sättigung von $\frac{a}{b}$ in eine solche von $\frac{a_1}{b_1}$ siehe S. 355.) Das bei der Halbsättigung ausfallende Globulin wird, wie sub 3 beschrieben, verarbeitet und schließlich gewogen. Das im Filtrat der Globuline bleibende Albumin wird nach dem sub 2 geschilderten Verfahren auskoaguliert und zur Wägung vorbereitet.

Beurteilung: Ob diese Art der Fibrinogenbestimmung eine quantitative ist, bleibt vorläufig unentschieden. Jedenfalls aber gibt sie bei mehreren Reihenversuchen relative Zahlenwerte. Die Methode ist außer für Blutplasma auch für vergleichbare Organ- und Knochenmarkextrakte anwendbar.

5. Isolierte Fibrinogenbestimmung. Man bringt die aus dem Fibrinogen durch Fibrinferment gebildete Fibrinmenge zur Wägung und setzt den gefundenen Fibrinwert als Näherungswert der vorhandenen Fibrinogenmenge gleich.

Als fibrinfermenthaltige Lösung benützt man frisches Blutserum, das man aus Blutplasma durch Schlagen von Fibrin befreit. Von dem ausgeschiedenen Fibrin filtriert man durch ein Leintuch ab und zentrifugiert zur Klärung. Nun setzt man zu 50 bis 100 cm^3 der fraglichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeit, die man in ein Becherglas genau abmißt, die gleiche Menge dieses frischen fermenthaltigen Blutserums. Zugleich stellt man mehrere Kontrollproben mit steigenden Mengen des Serumzusatzes an, um in jedem Fall auch zur Fibrinbildung ausreichende Fermentmengen zuzusetzen. Nachdem man die Mischung 24 Stunden bei 20 bis 30° belassen hat, bringt man durch Schlagen mit einem Glasstab das ausgeschiedene Fibrinnetz zum Zusammenballen, sammelt den Niederschlag auf einem gewogenen Filter, wäscht dann aufeinanderfolgend mit 1%iger Na Cl-Lösung, Wasser, heißem Alkohol und Äther und trocknet vor der Wägung bei 120° zur Gewichtskonstanz.

Die Fibrinmengen müssen in den verschiedenen Kontrollproben die gleichen sein, wenn die Fibrinogenumwandlung wirklich quantitativ abgelaufen ist.

6. Quantitative Bestimmung von Fibrin aus Blutplasma und Blut.

In ein kleines Becherglas von 100 cm^3 Inhalt reicht ein ruderförmiges Fischbeinstäbchen, das durch eine das Becherglas abschließende Gummikappe durchgesteckt ist (Fig. 13). Das so vor-

bereitete Glas wird trocken gewogen. In dasselbe fängt man direkt aus dem Blutgefäß 10 bis 40 *cm*³ Blut auf. Zur Bestimmung in Plasma wird eine abgemessene Menge des auf Eis aufbewahrten Plasmas verwandt.

Nach vollständigem Verschluß mit der Kautschukkappe schlägt man das Blut etwa zehn Minuten lang durch schnellende Bewegungen des Fischbeinstäbchens, natürlich ohne Lockerung des die Verdunstung verhindernden Kautschukverschlusses. Nunmehr wird der ganze gefüllte Apparat zur Bestimmung des Blutgewichtes kalt gewogen. Hierauf öffnet man und füllt das Glas fast vollständig mit Wasser an, rührt kräftig um und wartet, bis sich die Fibrinflocken zu Boden gesetzt haben. Hierauf gießt man das überstehende Wasser ab, ersetzt es durch neues, dem einige Tropfen Kochsalzlösung zugesetzt sind, und rührt aufs neue gut um. Nach dem Absetzen trennt man die oberen klaren Flüssigkeitsmengen wiederum durch Abgießen und fährt mit diesem Dekantieren so lange fort, bis das Fibrin hell und vor allem die über ihm stehende Flüssigkeit fast farblos geworden ist. Erst dann spült man das Fibrin quantitativ auf ein kleines gewogenes Filter. Die an dem Stäbchen haftenden Fibrinfasern werden mit einer Pinzette gleichfalls auf das Filter übertragen. Dann wäscht man das Fibrin mit Na Cl-haltigem Wasser bis zur Farblosigkeit oder nur noch Hellrosafärbung, übergießt dann zur Entfernung von Fetten und Extraktivstoffen mit siedendem Alkohol und und Äther und trocknet das Ganze bei 110 bis 120°. Nach dem Trocknen und Abkühlen im Vakuum wägt man. Verarbeitet man das Blut von Vögeln, Amphibien oder Fischen, so verwendet man als Waschflüssigkeit besser eine 1- bis 3%ige Lösung von Natriumsulfat an Stelle einer Kochsalzlösung.



Fig. 13.

B e u r t e i l u n g: Die Methode liefert nur Annäherungswerte, ist aber zur Bestimmung relativer Fibrinmengen gut verwertbar. Sie läßt sich bei richtigem Waschen durch ergiebiges Dekantieren, von der Trocknungszeit abgesehen, in wenigen Stunden beenden. Die Resultate werden nicht durch das Phänomen der Fibrinolyse fehlerhaft beeinflußt.

II. Die Eiweißkörper des Vogeleies.

Im Weißen des Hühnereies kommen vor: O v a l b u m i n, K o n a l b u m i n, O v o g l o b u l i n und O v o m u k o i d.

Im Gelben des Eies, d. h. im Eidotter, sind vorhanden die V i t e l i n e.

Als Eihüllen kommen vor: Albumoide (Ovokeratin) und Mukoide.

Proteine des Eiweiß:

1. Ovalbumin vgl. das Kapitel der kristallisierenden Proteine, S. 455. Die Menge beträgt etwa 50% der Eiweißproteine.

Konalbumin. Mit diesem Namen bezeichnet man ein nicht kristallisierendes Albumin, das angeblich ein vom Ovalbumin verschiedenes Albumin sui generis darstellt.

Darstellung aus Eiweiß (*Langstein*[1]).

Man verwendet die Mutterlaugen des durch Kristallisation abgeschiedenen Ovalbumins. Zu diesem Zweck befreit man Eierklar durch Schlagen von seinen Membranen und versetzt das klare Filtrat mit dem gleichen Volum einer gegen Lakmoid absolut neutral reagierenden, gesättigten Ammonsulfatlösung. Man filtriert von dem Niederschlag, der das Ovoglobulin enthält (siehe unten), ab und kristallisiert aus dem Filtrat das Ovalbumin nach einer der vorbeschriebenen Methoden aus. Nachdem sich aus der Mutterlauge auch nach Wochen keine Albuminkristalle mehr abscheiden, wird die filtrierte Lösung gegen fließendes Wasser bis zur fast vollständigen Entfernung der Schwefelsäurereaktion dialysiert und hierauf bei 50 bis 60° auf dem Wasserbade erhitzt. Hiebei scheiden sich die Reste von Albumin aus, die aus unbekannten Gründen der Kristallisation entgangen sind. Nach dem Abfiltrieren derselben erhitzt man die Lösung höher bis auf 90° und erhält das Koagulat des Konalbumins. Dasselbe wird abfiltriert, tagelang bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion und dem Versagen einer Phosphorwolframsäurefällung im Filtrat mit heißem Wasser gewaschen und schließlich bei 110° getrocknet.

Nach anderer Methode haben *Osborne* und *Campbell*[2]) ein Konalbumin dargestellt.

Beurteilung: Ob dieser Körper ein einheitliches spezifisches Protein darstellt, ist unbestimmt. Es besteht immer die Möglichkeit, daß Beimengungen eines dritten, ovomukoidartigen Körpers die Kristallisation dieser Fraktion verhindern, seine veränderte Salzfällbarkeit, spezifische optische Drehung und seine verschiedene Elementarzusammensetzung bedingen.

---

[1]) *L. Langstein*: Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. *Hofmeisters* Beitr. **1**. 82 (1902).

[2]) *Th. B. Osborne* und *G. F. Campbell*: Die Proteinbestandteile des Eiereiweißes. Journ. Amer. Chem. Soc. **22**. 422 (1900); Rep. Conn. Agricult. exp. Station. **23**. 348 (1900).

Zusammensetzung des Ovalbumins, kristallisiert	C	H	N	S	(α)D
Osborne und *Campbell*	52·82	7·03	15·32	1·59	— 29 bis 30°
Langstein	52·46	7·19	15·29	1·34	
des Konalbumins					
Osborne und *Campbell*	52·25	6·99	16·11	1·70	— 36 bis 39°
Langstein	52·23	6·96	15·98	1·75	

2. Ovoglobulin. 1. Darstellung nach *Langstein*[1]).

Eine filtrierte Eiklarlösung, die vorher durch Schlagen von Membranen befreit ist, wird mit dem gleichen Volumen gesättigter, neutraler Ammonsulfatlösung versetzt. Nach kurzer Zeit filtriert man den entstehenden Niederschlag ab, löst ihn in einer verdünnten Salzlösung und reinigt ihn durch mehrfach wiederholtes Ausfällen mit dem gleichen Volumen gesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung aus solcher Lösung. Diese Umfällungen führen zu großen Verlusten, da ein Teil des Globulins sehr bald in verdünnten Salzlösungen unlöslich wird und dann beim Filtrieren sehr hindernd wirkt. Man behilft sich daher mit Zentrifugieren.

Der unlösliche Globulinanteil ist bis jetzt nicht genauer untersucht. Er stellt möglicherweise kein besonderes Globulin, sondern nur ein verändertes Globulin dar (vgl. hiezu bei „Serumglobuline").

Der lösliche, mehrfach umgefällte und so gereinigte Anteil des Gesamtglobulins wird mit Alkohol aus seiner Lösung auskoaguliert, bis zum Verschwinden einer Schwefelsäurereaktion gewaschen und bei 110° getrocknet. Will man keine Fraktionierung vornehmen, so reinigt man das Gesamtglobulin der erstmaligen Ammonsulfatfällung derart, daß man den Niederschlag auf dem Filter mit einer Ammonsulfatlösung von 40% Sättigung wäscht. Nach drei bis vier Tagen sind die ablaufenden Filtrate biuretfrei. Man nimmt das Globulin vom Filter, verreibt es von neuem in einer Reibschale mit einer Ammonsulfatlösung von der genannten Konzentration, filtriert und wiederholt die Prozedur drei- bis viermal, um alles Ovalbumin und Ovomukoid zu entfernen.

2. Darstellungsmethode eines Globulins nach *Osborne* und *Campbell*[2]). Man fällt, wie sub 1 beschrieben, durch Halbsättigen mit Ammonsulfat, wäscht den Niederschlag gut mit 50%iger gesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung aus, löst ihn in wenig verdünnter Salzlösung und unterwirft die Lösung der Dialyse. Es fällt alsbald ein

[1]) *L. Langstein*: Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. *Hofmeisters* Beitr. **1.** 82 (1902).

[2]) *Th. B. Osborne* und *G. F. Campbell*: Die Proteinbestandteile des Eiereiweißes. Journ. Amer. Chem. Soc. **22.** 422 (1900); Rep. Conn. Agricult. exper. Station. **23.** 348 (1900).

gummiartiger Niederschlag aus, der abfiltriert und mit Wasser und Alkohol gewaschen wird (Globulin I = Ovomuzin im Sinne von *Eichholz*[1]).

Im Filtrat dieses Niederschlages findet sich ein zweites, wasserlösliches Globulin, das mit Ammonsulfat durch Sättigung gefällt und ganz wie das „Gesamtglobulin" nach *Langstein* gereinigt wird.

Beurteilung: Die Elementaranalysen und physikalischen und chemischen Eigenschaften der dargestellten Präparate reichen nicht aus, um die Globuline beider Darstellungsverfahren zu identifizieren. Die angewandte Methodik führt nur zu einem Protein von Globulineigenschaften, nicht zu einheitlichen Körpern.

Zusammensetzung nach	C	H	N	S	Asche	P
Langstein. Gesamtglobulin	51·93	7·04	15·17	1·99	0·24	—
„ lösliches Globulin . . .	51·46	6·98-7·03	15·12	1·64	0·21	—
Osborne u. *Campbell*. Gesamtglobulin	51·91	7·07	15·13	2·0	—	—
„ „ „ löslich. Globulin	50·67	7·04	15·16	1·66	—	—
„ „ „ unlösliches Globulin-Ovomuzin	50·69	6·71	14·49	2·28	0·53	+

Ein neuerer Versuch, die Eierglobuline zu fraktionieren, stammt von *Panormoff*. Die Resultate seiner Untersuchung zwingen nicht zu einer Wiedergabe seiner Methodik.

Qualitativer Nachweis eines Globulins in Eiereiweißlösungen geschieht durch die Globulinreaktion: Niederschlag bei Halbsättigung mit Ammonsulfatlösung oder Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat, Niederschlag bei Verdünnung, Bestimmung des Koagulationspunktes für das zuerst gereinigte fragliche Globulin und seiner Sättigungsgrenzen für Salzsättigungen.

3. Ovomukoid ist ein Eiweißkörper mit den Eigenschaften der Muzine und wird in der älteren Systematik zu den sogenannten Glukoproteiden gezählt, d. h. zu jenen schleimartigen Eiweißkörpern, an deren molekularem Aufbau eine Kohlehydratgruppe (das Glukosamin) beteiligt ist (vgl. Mukoide).

Das Ovomuzin von *Eichholz*, das durch Verdünnen von 1 Volum Eiereiweiß mit 3 Volumen Wasser gefällt wird, zählt trotz seines Gehaltes einer mit Säuren abspaltbaren Kohlehydratgruppe (vermutlich die Folge von echter Mukoidbeimischung) nicht zu den Muzinen, sondern zu den Ovoglobulinen (siehe oben). Das natürliche Hühnereiweiß enthält 1·45 bis 1·53% Ovomukoid.

Darstellung des Ovomukoides.

1. Nach *Mörner*[2]). Eine frische Lösung von Eierweiß wird in der Hitze unter passendem Zusatz von Essigsäure auskoaguliert.

[1]) *A. Eichholz*: Die Hydrolyse der Albuminstoffe. Journ. f. Physiol. **23.** 163 (1898).

[2]) *C. Th. Mörner*: Über eine im Hühnereiweiß in reichlicher Menge vorkommende Muzinsubstanz. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18.** 525 (1894).

Das klare Filtrat, das keine *Heller*sche Reaktion mehr zeigt, wird mäßig konzentriert und mit Alkohol niedergeschlagen; den Niederschlag preßt man ab, löst ihn erneut in Wasser und fällt in analoger Weise noch zweimal mit Alkohol um. (Die auch von *Nörner* angegebene Fällung durch Aussalzen mit Na_2 SO_4 erübrigt sich heute.)

2. Nach *Willanen*[1]). Man verdünnt Hühnereiweiß mit dem vierfachen Volumen Wasser, schüttelt gut durch, koliert ab und gießt die klare Lösung unter Zusatz von Essigsäure bis zu eben saurer Reaktion in das eineinhalbfache Volumen kochenden Wassers. Unter gutem Umrühren erhitzt man zuletzt zum starken Sieden und filtriert dann ab. Das Filtrat, das mit Quecksilberchlorid und Salpetersäure keinen Niederschlag gibt, wird auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingedampft, filtriert und in die fünffache Menge absoluten Alkohols gegossen.

Durch mehrfaches Lösen des abfiltrierten Niederschlages in Wasser und erneutes Fällen mit Alkohol, zuletzt durch Nachwaschen mit absolutem Alkohol und Äther entsteht ein trockenes Ovomukoidpulver.

3. Darstellung aus bereits koaguliertem Gesamteierweiß (*Willanen*). Man zerschneidet Hühnereiweiß fein, zerreibt es in einer Reibschale unter Zusatz von einer kleinen Menge Essigsäure mit einem großen Volumen Wasser und kocht dann auf. Ohne Essigsäurezusatz resultiert kein klares Filtrat. Sonst geschieht die Behandlung des Filtrates wie sub 2 beschrieben.

4. Nach *Milesi*[2]). Man koaguliert das Gesamteiweiß des Eierweißes durch Zusatz eines großen Überschusses von 99%igem Alkohol, filtriert die Fällung ab und trocknet sie im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur. Das gewonnene Pulver wird dann mit wenig kaltem Wasser extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit wird mit Alkohol nach 2 weiterbehandelt.

Nach *Mörner*[3]) kann das Ovomukoid in folgender Weise quantitativ bestimmt werden: 15 cm^3 Eierklar werden nach mehrtägiger Dialyse nach Zusatz von 1 cm^3 gesättigter Na Cl-Lösung und 0·3 cm^3 Essigsäure (1 : 5) mit destilliertem Wasser auf 150 cm^3 aufgefüllt und durch Erwärmen auf dem Wasserbad koaguliert. Ein aliquoter Teil des Filtrates wird auf zirka 10 cm^3 eingedampft und das Ovomukoid durch 5 Volumen 95%igem Alkohol gefällt.

[1]) *K. Willanen*: Über das Verhalten des Ovumukoids im Organismus. Biochem. Zeitschr. **1.** 109 (1906).

[2]) *C. Milesi*: Di un corpo phosphorato isolato dall'Albume d'uovo presentante i caratteri chim. di un mucoide. Bollet. della soc. med. Chirurg. Pavia 1898.

[3]) *Carl Th. Mörner*: Über Ovomukoid und Zucker in dem Weißen der Vogeleier. Zeitschr. f. physiol. Chem. **80.** 430 (1912).

Die Substanz wird nach mehrtägigem Stehen abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen, bei 105° getrocknet und zur Wägung gebracht.

B e u r t e i l u n g: Alle genannten Methoden führen zu Präparaten, die im wesentlichen einheitlich sind:

	C	H	N	S	P%	
Elementarzusammensetzung:	48·79	6·96	12·51	2·23	+	*Langstein*
			12·68	2·2		*Mörner.*

Das Mukoid enthält eine Kohlehydratgruppe, und zwar Chitosamin, in einer Menge von 34·9% auf Traubenzucker berechnet, das durch Säurespaltung, Pepsinverdauung und Fäulnis abgespalten werden kann. Dieses Chitosamin ist das einzige in dem Mukoid enthaltene Kohlehydrat (*Neuberg* und *Wolff*). Das Mukoid enthält keine Chondroitinschwefelsäure. Von den 2·22% Schwefel sind 1·39 bis 1·43% leicht abspaltbar.

Die s p e z i f i s c h e D r e h u n g des Ovomukoides beträgt im Mittel (*Mörner*) $(\alpha)_D^{18°} = -70·9$.

Von Eiweißreaktionen fallen positiv aus: die Xanthoprotein- und *Millon*sche Reaktion, die *Liebermann*sche Reaktion, die Reaktion nach *Adamkiewicz*, letztere nur bei Verwendung von Glyoxylsäure enthaltenden Eisessig. Ovomukoid ist durch Metallhydroxyde ausfällbar[1]).

Q u a l i t a t i v e r N a c h w e i s. Man beseitigt in der fraglichen Lösung die Proteine durch Auskoagulieren. Im Filtrat, das selbst nicht reduzieren soll, fällt man mit Alkohol und prüft den entstandenen Niederschlag auf den Gehalt einer Kohlehydratgruppe, indem man ihn mit 3%iger Salzsäure drei Stunden lang kocht und die neutralisierte Lösung mit *Fehling*scher Lösung auf Reduktionsfähigkeit prüft.

P r o t e i n e d e s E i d o t t e r s. Man bezeichnet die Dotterproteine als V i t e l i n e. Es sind dies Eiweißkörper mit Globulineigenschaften. Im Gegensatz zu diesen aber sind sie durch K o c h s a l z n i c h t f ä l l b a r. Da die Vitelline in der Form und Reinheit, die wir nach den gebräuchlichen Methoden zu erreichen vermögen, P h o s p h o r enthalten, glaubte man, die Vitelline in die Gruppe der Nukleoalbumine einreihen zu müssen. Da sie ferner, wie die Nukleoalbumine, bei der Spaltung durch Pepsinsalzsäure oder gelinde hydrolytische Agentien P a r a n u k l e i n e bezw. P a r a n u k l e i n s ä u r e n liefern, schien diese Gruppierung zu den Nukleoalbuminen um so mehr berechtigt. Es mag wohl sein, daß einige der Eierviteline, vielleicht jene der Fischeier, den Nukleoalbuminen nahestehen; trotzdem ist der Hinweis nötig, daß die

[1]) *J. Neumann*: Ovomukoid und Metallhydroxyde. Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**. 149 (1914).

Beteiligung des Phosphors am organischen Aufbau dieser Proteine noch keineswegs sichergestellt ist. Es fehlt bis heute an der Methode, diese Frage im positiven oder negativen Sinn zu entscheiden, und die Möglichkeit, daß der Phosphor einer Lezithin- oder Nukleoproteidverunreinigung entstammt, muß stets in Betracht gezogen werden.

1. Darstellung von Vitellin aus Vogeleidotter (*Weyl*[1]). Wan erschöpft den Dotter vom Hühnerei lange Zeit mit Äther. Die zurückbleibende weiße Masse wird in möglichst wenig 10%iger Kochsalzlösung gelöst und aus der filtrierten Lösung mit Wasser gefällt. Man erhält dabei einen Niederschlag, den man möglichst bald (noch vor dem Absitzen) abfiltriert, da er wie die Globuline sehr schnell seine Löslichkeit in Salzlösungen verliert. Das Lösen in Na Cl-Lösung und Fällen mit viel Wasser wird ein zweitesmal wiederholt. Zur Lösung braucht man meist nur wenige Tropfen der Kochsalzlösung. Die zuletzt gefällte Masse wird mit Alkohol extrahiert (zur Befreiung von Lezithin!) und mit Äther getrocknet. Der Körper stellt ein durch die Alkoholbehandlung sicher verändertes Rohvitellin dar.

Darstellung nach *Levene* und *Alsberg*[2]).

Der Eidotter wird mechanisch vom Eiweiß getrennt, mit dem gleichen Volumen 10%iger Na Cl-Lösung gemischt, mit Äther kräftig geschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen. Der abgeschiedene Äther wird beseitigt, die Lösung erneut mit Äther geschüttelt und wieder 24 Stunden sich selbst überlassen. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Ätherextraktion entsteht eine durchsichtige, leicht filtrierende Lösung, aus der Farbstoffreste durch erneute Ätherextraktion entzogen werden.

Zu der Na Cl-Lösung setzt man das 20fache Volumen Wasser. Nachdem sich der entstehende Niederschlag etwas gesenkt hat, hebert man das überstehende Wasser ab, ersetzt es durch frisches Wasser, rührt auf, läßt wieder absitzen und filtriert nach mehrmaligem Waschen in dieser Art zuletzt ab. Der Filterrückstand wird wieder in 10%iger Na Cl-Lösung gelöst und im Scheidetrichter nochmals mit Äther, wie oben beschrieben, durchgeschüttelt. Dann filtriert man die vom Äther getrennte Lösung und fällt mit einem großen Überschuß Wasser. Der Niederschlag wird dann mit kaltem oder heißem Alkohol extrahiert, mit Äther nachbehandelt und diese Extraktion so lange fortgesetzt, bis eine Äther- bezw. Alkoholprobe keinen Rückstand hinterläßt.

[1]) *Th. Weyl*: Beitrag zur Kenntnis tierischer und pflanzlicher Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**. 74 (1878).

[2]) *P. L. Levene* und *C. Alsberg*: Zur Chemie der Paranukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 543 (1901).

Beurteilung: Man gelangt zu einem Präparat, das 0·84 bis 1·21% Phosphor enthält.

Elementarzusammensetzung (*Osborne* und *Campbell*[1]):

C 51·24, H 7·16, N 16·38, S 1·04, P 0·94, Fe + %.

Die Menge vorhandenen Ovovitellins bestimmte *Barbieri*[2]) zu 20·73%.

Über die Paranukleinsäure des Vogelvitellins siehe bei Nukleoalbuminen.

2. Vitelline aus Dotter von Fischeiern.

Die sogenannten Dotterplättchen des Fischrogens stellen kristallisiertes „Vitellin" dar. Dieselben lassen sich in kristallisierter Form präparativ und zu Demonstrationszwecken darstellen.

Isolierung der Dotterplättchen: Man zerdrückt die Eier der Knorpelfische oder des Karpfens mit Wasser. Dabei scheiden sich reichlich Eiweißkörper ab. Diese werden mit Wasser geschlemmt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Es werden so „regelmäßige tafelförmige Körnchen" bezw. rektanguläre oder nahezu quadratische, platte Täfelchen gewonnen (*Valenciennes* und *Fremy*[3]), *Radlkofer*[4]). Die Körper sind identisch mit dem folgenden, als Ichthulin bezeichneten Dottereiweißkörper.

3. Ichthulin.

Darstellung aus Karpfeneiern (*Walter*[5]).

Die Eierstöcke der Karpfen werden aus der sie umgebenden Haut heraus präpariert und mit Wasser abgespült. Alsdann wird der Rogen gut mit ausgewaschenem Sand zerdrückt und mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt. Nach einer Stunde wird koliert und filtriert. Die Filtrate sind gelbbraun, opalisierend, trübe. Sie werden unter Umrühren in große Mengen Wasser eingegossen; die massige Trübung setzt sich nach Einleiten von Kohlensäure als flockiger Niederschlag ab. Das Rohichthulin ballt sich dann zu einer rötlichweißen, klebrigen Masse zusammen. Die überstehende

[1]) *Th. Osborne* und *G. F. Campbell*: Die Proteide des Eidotters. Rep. of Conn. Agricult. exp. Station. **23**. (1900); Journ. of Amer. Chem. Soc. **22**. 413 (1900).

[2]) *Nicola Alberto Barbieri*: Über die Nichtexistenz von freiem und gebundenem Lezithin im Eigelb. Gazz. chim. ital. **47**. 1 (I) (1915).

[3]) *A. Valenciennes* und *Frémy*: Recherches sur la composition des oeufs dans la série des animaux. Compt. rend. **38**. 471 (1854).

[4]) *L. Radlkofer*: Über Kristalle proteinartiger Körper pflanzlichen und tierischen Ursprunges. Leipzig 1859.

[5]) *G. Walter*: Zur Kenntnis des Ichthulins und seiner Spaltprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**. 477 (1891).

Flüssigkeit wird abgegossen, der Rest wird filtriert. Den Filterrückstand löst man in der ausreichenden Menge einer sehr verdünnten Magnesiumsulfatlösung und filtriert aufs neue. Das Filtrieren der klebrigen Lösung geht langsam vonstatten. (Da sich mit längerer Dauer der Salz- und Wasserwirkung ein beträchtlicher Anteil von Ichthulin als nunmehr unlöslicher Körper abscheidet, so gehen erhebliche Mengen bei dieser Filtration verloren.)

Das Filtrat wird erneut mit viel Wasser gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wird dann mit Alkohol und Äther auf dem Filter ausgewaschen.

Das Ichthulin stellt dann ein weißes, hygroskopisches Pulver dar, das sich beim Trocknen (110°) etwas gelblich färbt.

Elementarzusammensetzung: C 53·52, H 7·70, N 15·64, S 0·41, P 0·43, Fe 0·10% im Mittel.

In den Säurezersetzungsflüssigkeiten findet sich eine die *Fehling*sche Lösung reduzierende Substanz. Über das Paranuklein siehe die Nikleoalbumine.

Darstellung aus Kabeljaueiern (*Levene*[1]).

Der Fischrogen wird gut mit Sand zu einem Brei verrieben und in einer Handpresse ausgepreßt. Eier- und Sandgemisch werden in größeren Flaschen mit 5%iger Chlorammoniumlösung übergossen und erst allein, dann nach Zusatz großer, mehrfach gewechselter Äthermengen geschüttelt. Über Nacht hat sich der Äther abgetrennt. Die wässerige Schicht wird filtriert und mit dem 20fachen Volumen Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wird auf einem Filter mit Wasser gewaschen und in gleicher Weise behandelt (Lösen in $MgCl_2$-Lösung, Schütteln mit Äther, Filtrieren Fällen mit Wasser). Nun wird die Fällung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen. Es folgt eine Extraktion mit heißem und kaltem Alkohol, wodurch der vorher weiße Niederschlag orangegelb wird (!). Danach wird nochmals mit absolutem Alkohol und mit Äther getrocknet.

Das Ichthulin des Kabeljaueies enthält im Gegensatz zu jenem aus Karpfeneiern keine Kohlehydratgruppe.

Über die in ihm enthaltene Paranukleinsäure vgl. die Nukleoalbumine.

Die Elementaranalyse ergibt die Zusammensetzung:

C 52·44, H 7·45, N 15·96, S 0·92, P 0·65%.

[1]) *P. A. Levene*: Über das Ichthulin des Kabeljaus. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 281 (1901).



III. Die Eiweißkörper der Milch.

In der Milch sind die folgenden Eiweißkörper genauer bekannt: Kasein, Laktalbumin, Laktoglobulin und Opalisin.

1. Kasein ist ein Protein, das in der üblichen Systematik der Eiweißkörper zur Gruppe der Nukleoalbumine zählt, d. h. zu Proteinsubstanzen, die im wesentlichen Ähnlichkeit mit Globul'nen aufweisen und durch den Gehalt an Phosphor ausgezeichnet sind. Das Kasein verschiedener Tiergattungen scheint verschieden zu sein.

Im Anschluß an eine Bemerkung *Halliburtons* hat *Abderhalden*[1]) vorgeschlagen, die Namen „Kasein" und „Parakasein" durch die Bezeichnungen „Kaseinogen" und „Kasein" zu ersetzen. Eine einheitliche Durchführung dieser Umbenennung hat in der Literatur noch nicht stattgefunden.

Mellanby[2]) definiert Kaseinogen als das in der frischen Milch hauptsächlich vorkommende Protein; Säurekaseinogen ist das durch Säure ausgefällte Eiweiß, Kasein das durch proteolytische Fermente und Ca-Salze ausgefällte Eiweiß.

Darstellung aus Kuh- oder Ziegenmilch nach *Hammarsten*[3]). Man verdünnt die nach Möglichkeit schon etwas abgerahmte Milch mit dem vierfachen Volumen Wasser. Zu diesem Gemenge setzt man so viel Essigsäure, daß die verdünnte Lösung einen Gesamtsäuregehalt von 0·75 bis 1°/₀₀ Essigsäure gewinnt. Das sich alsbald abscheidende Kasein wird zugleich mit dem niedergerissenen Milchfett über Leinwand abfiltriert, danach in einer Reibschale unter Wasser möglichst fein zerrieben und unter Dekantieren der jeweils überstehenden Wassermenge möglichst zuckerfrei gewaschen. Nun wird mit Hilfe von möglichst wenig verdünntem Alkali (NH_3 oder 0·1 n-NaOH) gelöst. Die Kaseinlösungen werden filtriert. Ein Teil des Milchfettes wird bei dieser Filtration von den Filterporen zurückgehalten. Der größere Teil wird bereits vor dieser Filtration durch Abschöpfen beseitigt. In dem klaren oder nur leicht opalisierenden Filtrat wird die Kaseinfällung durch Zusatz von sehr wenig verdünnter Essigsäure wiederholt. Das Lösen des wieder abfiltrierten Kaseins und Fällen wird ein drittes Mal wiederholt. Die zuletzt entstehende Kaseinfällung wird auf dem Filter mit reichlichen Mengen destillierten Wassers

[1]) *E. Abderhalden*: Notizen (4). Zeitschr. f. physiol. Chem. **78.** 162 (1912).

[2]) *John Mellauby*: Die Darstellung und Zusammensetzung des Kaseinogens. Biochem. Journ. **9.** 342 (1915).

[3]) *O. Hammarsten*: Zur Kenntnis des Kaseins und der Wirkung des Labfermentes. Nov. Act. Reg. Soc. Sc. Upsala. Jahrg. **1877**; Autoreferat. *Malys* Jahresber. Jahrg. **1877**, S. 158. Ferner vgl. daselbst *Malys* Jahresber. Jahrg. **1872**, S. 118; **1874**, S. 135.

gründlich von den letzten Spuren Essigsäure befreit. Der Filterrückstand wird hierauf mit 97%igem Alkohol in kleinen Portionen zu einer Emulsion verrieben. Den sich bald absetzenden Kaseinanteil trennt man möglichst schnell von dem darüber stehenden Alkohol. Dieses Waschen mit Alkohol wird möglichst lange fortgesetzt. Zuletzt werden die Kaseinmengen auf dem Filter durch Waschen mit Äther von Alkohol befreit und hierauf in offenen Schalen innig mit Äther zerrieben. Dann wird das fein zerriebene Kasein im *Soxhlet*-Apparat einer energischen Ätherextraktion unterworfen. Dieselbe muß so lange fortgesetzt werden, bis eine Probe der Extraktionsflüssigkeit keinen Rückstand hinterläßt. Das nunmehr fettfreie Kasein wird im Vakuum oder bei einer Temperatur von 60 bis 70° getrocknet.

Eine Modifikation dieser Methode, welche die Entfettung erleichtert, haben *Danilewski* und *Radenhausen*[1]) angegeben.

2 *l* Milch werden mit 8 *l* Wasser verdünnt und mit 10 *cm*³ Eisessig versetzt. Das Kasein wird sofort gefällt. Nach Senkung desselben wird die saure Molke abgehebert. Das Kasein wird sofort mit 2 bis 4 *l* destilliertem, schwach angesäuertem Wasser gewaschen und über einem Leinwandtuch gut abgepreßt. Der Rückstand wird in einer Reibschale mit einer geringen Menge einer 1 bis 2%igen Ammoniaklösung gut verrieben. Der dicke Brei wird alsdann mit derselben Ammoniaklösung auf 1000 bis 1500 *cm*³ aufgefüllt, wobei er allmählich in Lösung geht. Hiebei scheidet sich das Milchfett sehr vollständig an der Flüssigkeitsoberfläche ab und wird leicht nach 24 Stunden abgerahmt. Durch Zusatz von 10 bis 12 *cm*³ Eisessig zur abgerahmten Lösung entsteht abermals eine Kaseinfällung, die noch zweimal in der beschriebenen Weise in 1- bis 2%igem NH_3 gelöst und mit Essigsäure wieder gefällt wird. Schließlich wird die letzte Säurefällung mit destilliertem Wasser auf Leinwand bis zur Neutralität der ablaufenden Flüssigkeit gewaschen, im *Soxhlet*-Apparat gut mit Alkohol und Äther erschöpft und an der Luft getrocknet.

Die mehrfache Umfällung aus schwach ammoniakalischer Lösung erhöht ohne Zweifel die Kaseinreinheit und erleichtert auch das Entfernen des Fettes, das sich in der ammoniakalischen Lösung leicht absetzt.

Großes Gewicht ist auf eine ergiebige Ätherextraktion zur Entfernung der letzten Fettspuren zu legen. Eine Kontrolle am Abdampfrückstand von Proben der Extraktionslösung ist immer geboten. Es sei ferner betont, daß selbst die als Caseinum

[1]) *A. Danilewski* und *P. Radenhausen*: Untersuchungen über die Eiweißstoffe der Milch. *Malys* Jahresber. Jahrg. **10**, S. 186 (1880); Forschungen aus dem Gebiete der Viehhaltung. Bremen. Jahrg. **1880**, S. 9.



purissimum nach *Hammarsten* (*Merck*) im Handel befindlichen Präparate keineswegs absolut fettfrei sind! Es muß daher eine solche Ätherextraktion oft tagelang fortgesetzt werden.

Nach *van Slyke* und *Bosworth*[1]) kann aschefreies Kasein (Kaseinogen) in folgender Weise gewonnen werden. Das Rohprodukt wird in verdünntem Ammoniak gelöst, durch Watte filtriert und mit Essigsäure gefällt; Lösung und Umfällung werden drei- bis viermal wiederholt; sodann wird die Substanz in starkem Ammoniak gelöst, mit gesättigter Ammonoxalatlösung versetzt und zwölf Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Flüssigkeit zentrifugiert, filtriert und mit verdünnter Salzsäure gefällt. Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen, mit 95%igem Alkohol verrieben, schließlich nacheinander mit absolutem Alkohol und mit Äther behandelt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Darstellung von Kasein aus Frauenmilch nach *Kobrak*[2]).

Man versetzt die zentrifugierte Milch mit einem Fünftel ihres Volums 0·1 n-Essigsäure und unterwirft diese Lösung fünf Tage lang im Pergamentschlauch der Dialyse gegen täglich erneuertes Chloroformwasser. Nach dieser Zeit erst hat sich das Kasein abgeschieden. Man zentrifugiert die Fällung aus, wäscht sie auf einem Papierfilter gut mit schwach angesäuertem (Essigsäure) Wasser, behandelt dann mit Alkohol und mit Äther und läßt eine energische Ätherextraktion im *Soxhlet*-Apparat nachfolgen. Schließlich trocknet man im Vakuum.

Die Elementaranalysen maximal gereinigter Kaseine (Kaseinogene) ergaben folgende Werte:

	C	H	N	S	P%	
Aus Kuhmilch:	52·96	7·05	15·65	0·758	0·847	*Hammarsten.*
			15·45	0·75	0·77	*Laqueur* u. *Sackur.*
	53·3	7·07	15·91	0·82	0·84-0·89	*Chittenden* u. *Painter.*
Aus Frauenmilch:	52·24	7·32	14·97	1·12	0·68	Asche 1%.

Für Kuhmilch beträgt $(\alpha)_D = -80^0$ in neutraler, -76^0 in alkalischer, -91^0 in salzsaurer Lösung. *Long* fand $(\alpha)_D = -97{\cdot}8$ $-111{\cdot}8^0$ in 0·1 n-Na OH-Lösung.

Reaktionen zur Feststellung eines Körpers als Kasein: Man löst den fraglichen Eiweißkörper in verdünnten Alkalien oder Alkalikarbonaten zu einer auf Lackmus neutral reagierenden Lösung

---

[1]) *L. L. van Slyke* und *A. W. Bosworth*: Darstellung von aschefreiem Kasein und Parakasein. Journ. of Biol. Chem. **14**. 203 (1913); **24**. 173 (1916).

[2]) *E. Kobrak*: Beiträge zur Kenntnis des Kaseins der Frauenmilch. *Pflügers* Arch. **80**. 69 (1900).

und fällt ihn mit Essigsäure. Ist durch mehrfaches Wiederholen dieser Prozedur der Körper einigermaßen gereinigt, so überzeugt man sich, daß seine salzfreie Lösung bei Erhitzung nicht koaguliert. Eine Probe des Körpers wird auf den Gehalt an Phosphor geprüft. Fällt diese Probe positiv aus, so bestimmt man, um sich vor einer Verwechslung mit einem Nukleoproteid zu schützen, ob der betreffende Körper Nukleinbasen enthält. Ist diese Probe negativ ausgefallen, so ist das Vorhandensein des Nukleoalbumins sichergestellt. Der endgültige und eindeutige Nachweis des Kaseins geschieht durch den Nachweis der Gerinnbarkeit des gelösten Kaseins mit Labferment.

Darstellung von Kaseinlösungen, die mit Lab gerinnen, nach *Courant*[1]).

Man löst ein nach *Hammarsten* dargestelltes Kasein in Kalkwasser und neutralisiert mit Phosphorsäure oder Salzsäure: Zum Beispiel 0·3 *g* Kasein werden in 10 *cm*³ gesättigtem Kalkwasser gelöst. Zu dieser Lösung fügt man 2·9 *cm*³ 1·1 n-Schwefelsäure. Will man statt dessen zur Neutralisation Phosphorsäure verwenden, so ist so viel Säure zuzusetzen als nötig ist, um das nicht an Kasein gebundene Kalzium in Trikalziumphosphat umzuwandeln. Eine solche Lösung gerinnt aber mit Lab noch nicht. Erst das Hinzufügen von mehr H_3PO_4 führt zu diesem Ziel, dadurch, daß auch der an Kasein gebundene Kalk in das Triphosphat verwandelt wird.

Beispiel: 0·3 *g* Kasein in 10 *cm*³ gesättigten Kalkwassers + + 3·1 *cm*³ 0·1 n-Phosphorsäure.

Im allgemeinen erhält man gut gerinnende Lösungen, wenn man mit dem Säurezusatz bis zur Neutralisation gegen Lackmus als Indikator fortschreitet.

Nach *Schryver*[2]) werden saure Lösungen von Kasein (Kaseinogen) durch Digerieren von halbgesättigtem Kalkwasser mit einem Überschuß des Proteins erhalten. Diese Lösungen flocken allein mit Labferment bei Zimmertemperatur aus.

Statt Kalkwasser kann man auch Natriumkarbonat als Lösungsmittel verwenden; in dem Falle löst man das Kasein in so viel stark verdünnter Sodalösung, daß eben eine gegen Lackmus neutral oder amphoter reagierende Lösung entsteht. Solche Lösungen von Kasein gerinnen aber nach Behandeln mit wirksamem Lab erst dann, wenn ein lösliches Kalksalz, z. B. $CaCl_2$, zugefügt wird.

[1]) *G. Courant*: Über die Reaktion der Kuh- und Frauenmilch und über ihre Beziehungen zur Reaktion des Kaseins und der Phosphate. *Pflügers* Arch. **50**. 109 (1891).

[2]) *Samuel B. Schryver*: Bemerkung über die Darstellung von Kasein aus Kaseinogen. Biochem. Journ. **8**. 152 (1914).



Umwandlungs- bezw. Spaltprodukte des Kaseins.

a) Durch Erwärmen auf 94 bis 100° und darüber hinaus erleidet das Kasein eine Spaltung. Es entsteht ein in verdünnten Laugen lösliches Isokasein (A) und ein in Laugen unlösliches, in ihnen nur gallertartig quellendes Albuminat, das Natriumkaseid (B). *Laqueur* und *Sackur*[1]).

Trennung beider Körper: Man erwärmt das trockene Kasein im Wärmeschrank während 12 bis 18 Stunden auf 102 bis 107°. Das so vorbehandelte Präparat wird in 0·1 n-Natronlauge aufgeschwemmt. Es geht A in Lösung, B bleibt als ziemlich feste, nicht gallertartige Masse, am Boden des Gefäßes sich absetzend, zurück. Dieser Rückstand wird so lange mit ganz verdünnten Laugen (n/200) gewaschen und wieder dekantiert, bis sich ein mit Phenolphthalein versetztes Wasser beim Aufschwemmen mit einer Probe des Rückstandes B von selbst rot färbt. Hierauf filtriert man B auf der Nutsche ab, wäscht mit großen Mengen Alkohols und Äthers und pulverisiert den Rückstand zu einem staubfreien gelblichen Pulver.

A kann in der für das Kasein beschriebenen Weise aus seiner Alkalilösung mit verdünnter Essigsäure gefällt werden. Die Reinigung erfolgt wie dort durch mehrfaches Umfällen.

b) Parakasein (wäre nach *Halliburton-Abderhaldens* Vorschlag als „Kasein" zu bezeichnen!) ist derjenige Eiweißkörper, der aus Kasein unter dem aller Wahrscheinlichkeit nach spaltenden Einfluß von Labferment entsteht und der bei Labwirkung auf genuine Milch in Form des unlöslichen parakaseinsauren Kalkes (Käse) ausfällt.

Darstellung von Parakasein aus reinem Kasein[2]). Man löst reines Kasein nach *Hammarsten* in der zur Lösung eben nötigen Menge verdünnter Natronlauge. Zu dieser Natriumkaseinlösung von nahezu neutraler Reaktion setzt man eine ausreichende Menge von wirksamem Labferment (Magensaft, Magenschleimhaut usw., am besten Labpulver) und hält die Lösung etwa zehn Minuten im Brutschrank bei 37°. Alsdann zerstört man das Lab durch Erhitzen auf 90° und verdünnt mit dem vierfachen Volumen Wasser. Nun versetzt man die Lösung vorsichtig mit sehr verdünnter Essigsäure bis zu beendeter Fällung, filtriert den flockigen

[1]) *E. Laqueur* und *D. Sackur*: Über die Säureeigenschaften und das Molekulargewicht des Kaseins und seine Spaltung beim Trocknen. *Hofmeisters* Beitr. **3**. 193 (1903).

[2]) *K. Koester*: Einige Beiträge zur Kenntnis des Kaseins und seiner Gerinnung mit Labferment. Upsal. läkaref. Forh. S. 16; *Malys* Jahresber. **11**. 14 (1881).



Niederschlag ab und löst ihn wieder in ganz verdünnter Natronlauge. Die Umfällung mit verdünnter Essigsäure aus der alkalischen Lösung wird zweimal wiederholt. Der zuletzt entstehende Niederschlag wird auf dem Filter gut mit Wasser gewaschen und rasch mit Alkohol und Äther nachbehandelt.

Wenn es sich nicht um die Reindarstellung des Parakaseins handelt, so kann man den Körper aus seiner Lösung durch Neutralsalze (Halbsättigung mit Ammonsulfat, Ganzsättigung mit rohem, d. h. kalkhaltigem Kochsalz) aussalzen. Die Salzfällung wird der Dialyse unterworfen, wobei Lösungen von reinem Parakasein entstehen.

Eine Darstellung des Parakaseins aus seinem Kalksalz, d. h. aus dem Kasein etwa durch Lösen mit Soda und Fällen desselben mit Säure führt nicht zu einem unveränderten Parakasein.

Elementarzusammensetzung: C 53·94, H 7·14, N 15·14, S 1·01, P 1·3%.

Qualitativer Nachweis des Parakaseins (zugleich als Kaseinnachweis verwertbar). Zu der bei 37° belassenen kalkfreien Lösung von Kasein mit Labferment setzt man eine Spur eines löslichen Kalksalzes, am besten Kalziumchlorid. Bei einem Gehalt von 0·2% Chlorkalzium erfolgt sofort eine Abscheidung in Form des flockigen Käses.

Quantitative Bestimmung des Parakaseins. Man bestimmt in einer abgemessenen Probe der der Labwirkung unterworfenen Kaseinlösung den Gesamtstickstoffgehalt. Eine Multiplikation dieses Wertes mit 6·24 ergibt den Gehalt an Eiweiß (Kasein).

In einer gleichgroßen Probe fällt man das entstandene Parakasein mit Essigsäure. Die entstandene Fällung bringt man quantitativ auf ein Filter und wäscht den Filterrückstand so lange mit Wasser aus, bis die Waschflüssigkeit keine Biuretreaktion mehr geben. Den Niederschlag verascht man alsdann feucht und bestimmt den N-Gehalt nach *Kjeldahl*. Der gefundene Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt die Menge Parakasein.

Die Methode gestattet das Auffinden von Annäherungswerten über die Mengenverhältnisse, in denen sich das Kasein in Parakasein und andere Proteinbestandteile (siehe unten) zerlegt.

Versuche der Zerlegung des Parakaseins in einzelne Fraktionen (nach *v. Herwerden*[1]) scheinen zu beweisen, daß auch das durch Essigsäure fällbare Parakasein aus zwei Körpern besteht[2]).

[1]) *M. v. Herwerden*: Beitrag zur Kenntnis der Labwirkung auf Kasein. Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**. 184 (1907).

[2]) Vgl. auch *A. J. J. Vandervelde*: Über fraktionierte Fällung der Milchproteine. Biochem. Zeitschr. **29**. 461 (1910).

Man läßt Lab auf eine ganz schwachsaure Natriumkaseinatlösung drei Stunden einwirken. Hierauf unterbricht man die Fermentwirkung durch Erwärmen auf 90° und fällt das gebildete Parakasein mit Essigsäure. Nun löst man den von Essigsäure durch Waschen befreiten Niederschlag mit ganz verdünnter Natronlauge bis zu schwachsaurer Reaktion der Lösung und fällt nun mit einem Überschuß von $Ca\,Cl_2$. Dieser Niederschlag stellt die Kalkverbindung eines Parakaseins A dar.

Im Filtrat dieser Fällung läßt sich ein durch Ca-Salz nicht mehr fällbares Parakasein B mit verdünnter Essigsäure ausfällen. Diese Fällung hat vorsichtig zu erfolgen, in der Weise, daß so viel Essigsäure verwandt wird, um in dem Filtrat der Fällung die Reaktion mit Ferrozyanwasserstoff eben zum Verschwinden zu bringen. Im Filtrat des erstmalig durch Essigsäure gefällten Parakaseins A + B ist ein Parakasein C enthalten, das durch Sättigen der Lösung zu 60% gesättigter Ammonsulfatlösung oder durch Tannin ausgefällt wird.

Die drei Körper sind bisher nur qualitativ bestimmt und differenziert.

c) Das Molkeneiweiß (Hemikaseinalbumose, Laktoserumproteose). Mit diesem Namen bezeichnet man die Gesamtheit der Eiweißkörper, die sich in dem Filtrat eines durch Labwirkung aus Kasein entstandenen Parakaseins finden und nach der Beseitigung des Parakaseins als Kalksalz oder durch Essigsäurefällung gelöst bleiben.

Aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich um eine Mehrzahl von Proteinkörpern, deren Menge und Natur von der Dauer der Labwirkung, d. h. dem Grade der Kaseinzerlegung in Parakasein und Molkeneiweiße abhängt.

Qualitativer Nachweis und quantitative Bestimmung des Molkeneiweiß [1], [2]. Man stellt sich eine Lösung von reinem Kasein dar, indem man dasselbe in der eben ausreichenden Menge einer 1%igen $Na_2\,CO_3$-Lösung auflöst. Diese frisch bereitete Lösung wird durch Zentrifugieren geklärt. Abgemessene Proben werden mit einer frischen Lablösung (1 Teil käufliches Labpulver auf 10.000 Teile Wasser) versetzt und auf ein gleiches Volumen aufgefüllt. Nach beliebigen Verdauungszeiten (bei 37°) unterbricht man die Labwirkung durch Erhitzen auf 90 bis 95° und fällt das gebildete Parakasein durch Zusatz des gleichen Volums einer gesättigten Ammonsulfatlösung zu der

[1]) *E. Petry*: Über die Einwirkung von Labferment auf Kasein. *Hofmeisters* Beitr. **8**. 339 (1906).

[2]) *S. Schmidt-Nielsen*: Die Beziehung des Molkeneiweißes zur Labgerinnung (Parakaseinbildung). *Hofmeisters* Beitr. **9**. 322 (1907).

Labprobe aus. Das Filtrat dieses Niederschlages wird durch Zufügen von $Am_2 SO_4$ auf Ganzsättigung gebracht. Hiedurch entsteht ein zweiter Niederschlag aus Molbeneiweiß (qualitativer Nachweis!). Will man relative Werte zur Bestimmung des gebildeten Molkeneiweiß erhalten, so bestimmt man in den unverdünnten Filtraten des Parakaseins die Stickstoffmenge. Sind 90 *cm*³ einer 2%igen Natriumkaseinatlösung der Labwirkung ursprünglich ausgesetzt, so fügt man dieser Lösung nach Zerstören des Labs 40 *g* festes Kochsalz (Rohsalz mit im Mittel 0·4% Ca und 0·05% Mg) zu, filtriert von dem sich abscheidenden Parakasein ab und bestimmt in 50 *cm*³ des nicht verdünnten Filtrates (= entsprechend 90 *cm*³ ursprünglicher Lösung) den Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl.* Man gewinnt so relative Zahlenwerte über die nach wechselnden Zeiten gebildeten Molkeneiweißmengen.

Bei allen diesen Versuchen ist die Wirksamkeit des Labs zu kontrollieren. Man verwendet am besten die zwei- bis dreifache Menge einer Lablösung, die zur Parakaseinbildung binnen zehn Minuten benötigt wird.

Der N-Gehalt der Lablösung (0·005%) darf vernachlässigt werden.

d) Molkenalbumose. Man versteht unter dieser Bezeichnung einen Eiweißkörper, der von *Fuld* aus den Molkeneiweißen isoliert worden ist. Bei ihrem Nachweis läßt *Fuld* die Parakaseinbildung unter besonderen Bedingungen vor sich gehen, die eine sekundäre Hydrolyse vollständig ausschließen.

Darstellung und Nachweis einer Molkenalbumose nach *Fuld*[1]).

Man geht von einer nach *Courant* (vgl. S. 507) dargestellten Kaseinlösung aus. Auch Kaseinpräparate der Firma *Rhenania* in Aachen sind verwertbar. Kasein, meist 10 *g*, wird mit einer geringen Menge Kalkwasser angerührt und unter Umrühren und Erwärmen auf dem Wasserbade fast vollständig in Lösung gebracht.

Dann neutralisiert man die Lösung mit einer stark verdünnten Phosphorsäure unter Kontrolle des Neutralisationspunktes durch Tüpfeln auf Lackmuspapier. Die bleibende milchweiße Lösung wird mit reinen Eisstückchen rasch unter 10° abgekühlt und mit einer ausreichenden Menge trockenen Labpulvers versetzt. Nun wird die Lösung im Eisschrank bei einer unter 10° liegenden Temperatur belassen. Diese künstliche Milchlösung gerinnt in der Kälte. Das voluminöse Gerinnsel wird auf ein schnell filtrierendes Filter gebracht und aus der klar abfließenden Molke das noch gelöste Kasein und das schon gebildete, aber noch nicht ausgefallene Parakasein mit

[1]) *E. Fuld*: Über die Molkenalbumose. Biochem. Zeitschr. 4. 488 (1907).

Essigsäure gefällt. Der Zusatz der Essigsäure hat vorsichtig zu geschehen, um jeden Überschuß zu vermeiden. Es genügen zur Fällung ganz geringe Mengen verdünnter Säure, deren Wirkung noch durch das Freiwerden der in Freiheit gesetzten zweiten Phosphorsäurevalenz erhöht wird.

Nun wird das Filtrat dieser Säurefällung zur quantitativen Beseitigung der Kasein- bezw. Parakaseinreste auf dem Wasserbade auf 70° erhitzt, eventuell, wenn nötig, mit weiteren geringen Mengen Essigsäure versetzt.

Das nunmehr gewonnene Filtrat enthält die Molkenalbumose, die entweder indirekt durch N-Bestimmungen oder direkt durch qualitative Reaktionen nachweisbar ist.

Eine Reindarstellung der Molkenalbumose aus dieser Lösung, etwa durch Aussalzen, ist wegen des gleichzeitigen Gehaltes an Kalzium oder Phosphorsäure nicht möglich.

Der qualitative Nachweis einer Molkenalbumose wird durch die folgenden Reaktionen erbracht. Mit Essigsäure tritt weder in der Wärme noch in der Kälte eine Fällung auf. Mit Salpetersäure entsteht eine Trübung, die sich beim Erwärmen klar löst und beim Abkühlen wiederkehrt. Die Reaktion ist auch in verdünnten Lösungen positiv. In gleicher Weise wirkt die Salzsäure. Für diesen durch Mineralsäuren fällbaren Anteil des Gesamtmolkeneiweiß wählt *Fuld* den Namen der Molkenalbumose. Aus dem Gehalt an Stickstoff im Gesamtmolkeneiweiß des letzten Filtrates und dem der Meneralsäurefällung ergibt sich, daß die fällbare Molkenalbuminose nur etwa die Hälfte des Molkeneiweiß darstellt.

2. Laktalbumin. Die Isolierung erfolgt analog den S. 458 ff. beschriebenen Albuminen[1]).

3. Laktoglobulin. Darstellung nach *Sebelien*[2]).

Man befreit zunächst die Milch von Kasein. Man sättigt zu diesem Zweck die Milch, die man vorher zu amphoterer Reaktion neutralisiert hat, mit pulverisiertem Kochsalz in Substanz unter gutem Umrühren. Von der Fällung, die ganz aus Kasein, zum geringsten Teil aus Spuren von Globulin besteht, filtriert man ab. Das klare Filtrat sättigt man mit pulverisiertem Magnesiumsulfat, wobei eine flockige Fällung entsteht. Der Körper wird auf dem Filter gesammelt, zwischen Filtrierpapier abgepreßt, in wenig Wasser gelöst (die noch anhaftenden Salzmengen genügen zur

[1]) Vgl. dazu *L. Lindet*: Über die löslichen Eiweißstoffe der Milch. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **157**. 307 (1913).

[2]) *J. Sebelein*: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**. 453 (1885).

Lösung des Globulins) und aus dieser Lösung erneut mit $Mg SO_4$ bei Ganzsättigung gefällt. Den zweimal umgefällten Körper löst man in Wasser und unterwirft ihn der Dialyse.

Aus der Lösung scheidet sich das Globulin beim Dialysieren meist nicht aus, höchstens entsteht eine Trübung, die durch eine Spur Kochsalz wieder in Lösung geht. Die Lösung fällt man mit Alkohol und trocknet das gefällte Globulin in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther.

Die Darstellung eines reinen Globulins aus Molke, d. h. aus dem Filtrat einer Käsefällung, ist nicht ratsam, da auch Anteile des Molkeneiweiß oder nicht gefällte Parakaseinanteile bei einer $Mg SO_4$-Sättigung mit ausfallen können.

Der Körper scheint mit dem Serumglobulin identisch zu sein. Koagulationstemperatur 72° in 5- bis 10%iger Na Cl-Lösung.

4. Opalisin ist ein nicht globulin- oder albuminartiger Körper, der sich in den Mutterlaugen des durch Essigsäure gefällten Kaseins von Frauen-, Stuten- und Kuhmilch findet. Am reichsten ist seine Ausbeute aus Frauenmilch, am geringsten aus Kuhmilch.

Die Mengen und Eigenschaften dieses Körpers, ebenso wie die von *Wroblewski*[1]) angewandte Darstellungsmethode sind so wenig präzisiert, daß die Besprechung dieses atypischen Proteins hier übergangen werden darf.

5. Einen neuen Eiweißkörper der Milch fanden *Th. Osborne* und *A. Wakeman*[2]) durch Waschen großer Mengen Kasein mit Alkohol. Der Körper, der dem Gliadin ähnelt, ist in 50- bis 70%igem Alkohol löslich, unlöslich in absolutem Alkohol und wenig löslich in salzhaltigem Wasser. Seine Elementarzusammensetzung ist:

C 54·31, H 7·17, N 15·71, S 0·95, P 0·08.

Beziehungen zum Kasein soll dieser Stoff nicht haben.

6. Die Eiweißkörper des Kolostrums sind nach den für die Milch gültigen, oben beschriebenen Methoden darstellbar: *Tiemann*[3]), *Sebelien* (l. c. S. 512, Note 2). Das Kolostrumkasein ist in Spuren vorhanden und mit dem der Milch identisch[4]).

[1]) *A. Wroblewski*: Ein neuer eiweißartiger Bestandteil der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 308 (1893).

[2]) *Thomas B. Osborne* und *Alfred J. Wakeman*: Ein neuer, in Alkohol löslicher Eiweißkörper der Milch. Journ. of Biol. Chem. **33**. 243 (1918). Vgl. ebenda. S. 7.

[3]) *H. Tiemann*: Untersuchungen über die Zusammensetzung des Kolostrums mit besonderer Berücksichtigung der Eiweißkörper desselben. Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**. 363 (1898).

[4]) Vgl. *Charles Crowther* und *Harold Raistrick*: Eine vergleichende Untersuchung der Proteine des Kolostrums usw. Biochem. Zeitschr. **10**. 434 (1916).

Das Kolostrumglobulin, nach der Methode von *Sebelien* dargestellt, scheint, nach der Elementarzusammensetzung zu schließen (C 49·83, H 7·77, N 15·28, S 1·24, C 25·88%), von dem der Milch verschieden. Indes ist zu bedenken, daß das von *Sebelien* analysierte Präparat keinen Anspruch auf absolute Reinheit machen kann, oder daß in dem von *Tiemann* analysierten Kolostrumglobulin nur ein Globulinanteil, etwa der wasserlösliche Anteil, vorgelegen hat. (Vgl. hiezu den Absatz über die Mehrzahl der Serumglobuline.)

Methoden zur quantitativen Bestimmung der Proteine in der Milch.

1. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes der Milch. Fällung mit Gerbsäure: *Sebelien*[1]). Man verdünnt 5 oder 10 *cm*³ Milch mit dem neunfachen Volumen Wasser, fügt etwas physiologische Kochsalzlösung hinzu und setzt nun einen Überschuß, etwa das eineinhalbfache Volumen der angewandten unverdünnten Mischung an Almenscher Gerbsäurelösung hinzu (siehe S. 465). Die durch die Gerbsäure entstehende Fällung läßt man absitzen; dann trennt man die überstehende Flüssigkeit ab, schickt diese durch ein gewogenes, trockenes Filter, filtriert und spült dann den Niederschlag quantitativ nach. Der Filterrückstand wird mit kaltem Wasser nachgewaschen. In ihm wird nach *Kjeldahl* der Stickstoff bestimmt. Der gefundene N-Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt den Gehalt an Gesamteiweiß.

2. Fällung mit Alaun und Kupferoxydhydrat nach *Ritthausen-Munk*[2]). Man verdünnt 10 *cm*³ Milch in einem 250 *cm*³ fassenden Becherglas auf 100 *cm*³ mit Wasser, neutralisiert die möglicherweise alkalisch reagierende Lösung und erhitzt. Vor dem beginnenden Sieden fügt man 1 bis 2 *cm*³ Alaunlösung zu, bei eben beginnendem Sieden 2 bis 5 *cm*³ von aufgeschwemmtem, alkalifreiem Kupferoxydratbrei. Dann kocht man einige Minuten lang. Der feinflockige Niederschlag der Fällung setzt sich schnell nach Entfernen der Flammen ab. Man filtriert noch warm, wäscht den Filterrückstand mit heißem Wasser aus, verascht den Niederschlag mitsamt dem Filter feucht und bestimmt den Stickstoff nach *Kjeldahl*. Der gefundene N-Wert ergibt, mit 6·37 multipliziert, den gesuchten Proteingehalt.

Ebenso kann Aluminiumhydroxyd direkt zur Fällung verwendet werden; man stellt das Hydroxyd durch Ausfällen einer

---

[1]) *J. Sebelien*: Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweißkörper mit besonderer Berücksichtigung der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 157 (1889).

[2]) *J. Munk*: Die quantitative Bestimmung der Eiweiß- und Extraktivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. Arch. f. path. Anat. **134**. 501 (1893).

5%igen Ammoniumalaunlösung mit Ammoniak dar, reibt es nach der Reinigung mit Wasser zu einer dünnen Gallerte an und fällt mit 200 cm^3 derselben 25 cm^3 Milch[1]).

3. Bestimmung von Kasein und Albumin + + Globulin in Tiermilch (mit Ausnahme der Eselinnenmilch). Man mischt 20 cm^3 Milch mit 380 cm^3 Wasser und fällt unter Umrühren so lange mit verdünnter Essigsäure, bis sich ein flockiger Niederschlag bildet. Man beendet hierauf die Kaseinfällung durch Einleiten von Kohlensäure während einer halben Stunde. Hierauf läßt man bis zum anderen Tag stehen. Da die Kaseinfällung nicht unter allen Umständen so gelingt, daß sich der Niederschlag gut zu Boden absetzt, so macht man diese Säurefällung gleichzeitig an drei verschiedenen Milchproben und wählt dann die bestgelungene zur weiteren Verarbeitung. Man filtriert zunächst die klare Flüssigkeit, dann den Niederschlag quantitativ durch ein N-freies Filter und wäscht den Filterrückstand gut mit Wasser aus.

Dieser Filterrückstand wird mit starkem Alkohol übergossen. Die erst trübe durchlaufenden Filtrate werden wieder aufgegossen, bis ein klar ablaufendes Filtrat entsteht. Ist der Filterrückstand gut mit Alkohol durchgefeuchtet, so läßt man diesen erst bei 40° verdunsten und wäscht dann mit Äther nach. Nun bringt man das gesamte Filter mit dem Rückstand in die Hülse eines *Soxhlet*-Apparates und extrahiert lange Zeit mit Äther.

Das nun entfettete Kasein wird mitsamt dem Filter verascht und auf seinen N-Gehalt nach *Kjeldahl* untersucht. Der N-Wert $\times$ $\times$ 6·37 = Kaseinwert. Das Filtrat der ersten Kaseinfällung wird auf Albumin und Globulin verarbeitet, indem man beide Eiweißkörper durch Erhitzen der Lösung auskoaguliert, auf einem Filter quantitativ sammelt, auswäscht und dann nach *Kjeldahl* auf ihren N-Gehalt bestimmt. Dieser Wert $\times$ 6·37 = Albumin + Globulinwert.

Nach *Malenfaut*[2]) fällt man das Kasein mit 65%igem Alkohol, der 1‰ Essigsäure enthält, wäscht den Niederschlag mit 50%igem Alkohol aus, behandelt ihn dann nacheinander mit 95%igem Alkohol, Azeton (siedend) und Äther (siedend), trocknet sieben Stunden bei 100° und wägt.

Bei Verarbeitung von Frauenmilch nach dieser Methode muß die Essigsäure- und Kohlensäurefällung des Kaseins in der auf 40° erwärmten Milchwasserlösung ausgeführt werden, um eine Abscheidung des Kaseins zu erzielen.

---

[1]) *William H. Welker* und *Howard L. Marsh*: Aluminiumhydroxyd als proteinfällendes Agens. Journ. Amer. Chem. Soc. **35**. 823 (1913).

[2]) *R. Malenfaut*: Vereinfachte Technik zur genauen Bestimmung des Kaseins. Journ. Pharm. Chim. (7.) **6**. 390 (1912).

4. Bestimmung von Kasein und Globulin + + Albumin nach *Schlossmann*[1]). 10 *cm*³ Milch werden mit 30 bis 50 *cm*³ Wasser verdünnt, auf dem Wasserbad auf 40° erwärmt und mit 1 *cm*³ einer konzentrierten Lösung von Kalialaun versetzt. Erfolgt nicht alsbald unter Umrühren eine mittelflockige Abscheidung, so fügt man in Abständen von je einer halben Minute noch 0·5 *cm*³ Alaunlösung hinzu, bis das gewünschte Ziel erreicht ist. (Ein Alaunüberschuß von mehr als 1 *cm*³ ist zu vermeiden.) Während der Fällung soll die Temperatur dauernd 40° betragen. Nun filtriert man quantitativ durch ein stickstofffreies Filter, bis man ein klar abfließendes Filtrat gewinnt, und wäscht den Filterrückstand gut mit Wasser aus.

Eine N-Bestimmung nach *Kjeldahl* im Filterrückstand ergibt den Kaseingehalt (siehe sub 3).

Das klare Filtrat der Alaunlösung wird mit 10 *cm*³ *Almen*scher Gerbsäurelösung versetzt und nach der sub 1 beschriebenen Methode weiter verarbeitet.

5. Bestimmung von Albumin und Kasein + + Globulin. 10 *cm*³ Milch werden mit 30 bis 40 *cm*³ einer gesättigten $MgSO_4$-Lösung versetzt. Hierauf trägt man bei einer Temperatur von 40° portionenweise fein pulverisiertes Magnesiumsulfat bis zur Sättigung ein. Von dem Globulin- und Kaseinniederschlag filtriert man nach einigen Stunden durch ein N-freies Filter ab und wäscht mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung nach. (Die Filtration geht sehr langsam vonstatten!)

Aus dem Filtrat, das man mit Wasser verdünnt, fällt man das Albumin durch Hitzekoagulation unter Essigsäurezusatz. Der sich abscheidende Niederschlag wird auf einem N-freien Filter quantitativ gesammelt, gut ausgewaschen und auf seinen N-Gehalt nach *Kjeldahl* verarbeitet. Der N-Wert × 6·37 ergibt den Albumingehalt.

Die $MgSO_4$-Fällung wird nach einer der vorbeschriebenen Methoden entfettet und nach *Kjeldahl* auf den N-Gehalt untersucht. Dieser Wert, mit 6·37 multipliziert, ergibt den Wert für Globulin + + Kasein.

Zur Bestimmung des Laktalbumins verfahren *Walker* und *Cadenhead*[2]) wie folgt: Das Kasein wird mit Essigsäure gefällt, das klare Filtrat mit Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert, die Rotfärbung mit einem Tropfen 10%iger Essigsäure be-

[1]) *A. Schlossmann*: Über Eiweißstoffe der Milch und die methodische Trennung derselben. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 221 (1897).

[2]) *W. O. Walker* und *A. F. Grant Cadenhead*: Mitteilung über die Fällung von Laktalbumin in Kuhmilch. Journ. of Ind. and Engin. Chem. **6**. 573 (1914).



hoben, die Flüssigkeit auf 40 bis 50° erwärmt und sodann mit *Alméns* Reagens (siehe S. 465) im Verhältnis von 12 *cm*³ auf 10 *cm*³ Milch versetzt. Man rührt zwei Minuten um, läßt eine halbe Stunde stehen, filtriert und verascht Filter + Niederschlag nach *Kjeldahl.*

IV. Proteine des quergestreiften Muskels.

Als Muskelproteine sind bekannt das Myosin (Myosinfibrin), Myogen (lösliches Myogenfibrin, unlösliches Myogenfibrin) und Myoproteid (Nukleoproteid). Die Körper in Klammern sind Umwandlungsprodukte der vorangestellten Proteine.

Als Ausgangsmaterial der Darstellung dieser Proteine dient ein Muskelplasma, das aus vollkommen blutfreien Muskeln gewonnen wird[1]).

Entblutung. In die Jugularvene eines Tieres läßt man 250 bis 400 *cm*³ einer auf 35 bis 40° erwärmten physiologischen Kochsalzlösung einfließen. Bei einem Verbrauch von 100 bis 200 *cm*³ beginnt ein Zittern des Tieres, doch wird die Prozedur im ganzen gut ertragen. Das Einfließen hat langsam zu erfolgen und muß bei Herzarhythmie oder verlangsamter Herzaktion für einige Minuten unterbrochen werden. Nach dem Verbrauch dieser Menge (400 *cm*³) und bei noch guter Herzaktion läßt man aus der Karotis verbluten, während gleichzeitig der Rest der Kochsalzlösung nunmehr schnell nachfließt. Zugleich macht man tüchtige Herzmassage. Vor dem Todeseintritt sollen zweckmäßig 300 bis 600 *cm*³ Na Cl-Lösung bereits zugeflossen sein.

Sofort nach dem Tode eröffnet man das Abdomen, präpariert die Aorta frei, bindet unterhalb des Abganges der Nierenarterie eine Kanüle ein und läßt unter erheblichem Druck so lange Kochaslzlösung zufließen, bis die aus der Hehlvene ablaufende Flüssigkeit farblos bleibt. Unter Beuge- und Streckbewegung der Extremitäten beschleunigt man diesen Prozeß. Meist genügen im Maximum 1200 *cm*³ als Spülflüssigkeit.

Muskelplasma. Man präpariert die Muskeln der Extremitäten ab, zerkleinert sie mit dem Wiegemesser (keine Fleischhackmaschine verwenden!), zerhackt sie mit demWiegemasser fein und zerreibt den Gewebebrei mit Bimsstein und einer 0·6%igen Kochsalzlösung zu einem Brei- Dieser wird sofort oder nach Aufheben im Eisschrank in ein Koliertuch eingeschlagen und in der Tinkturenpresse ausgepreßt. Die ablaufende Flüssigkeit wird durch Faltenfilter filtriert. Bei einiger Geschicklichkeit läßt sich die ganze

---

[1]) *O. v. Fürth*: Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. **36.** 231 (1895).



Prozedur vom Beginn der ersten Durchspülung in 25 bis 30 Minuten ausführen.

Bottazzi[1]) verwendet zur Darstellung des Muskelsaftes die *Buchner*-Presse und sucht zur Zerreibung der Muskeln ein Optimum der Menge von Kieselgur und Quarzsand.

Die Flüssigkeit stellt das Muskelplasma dar, das frei von Albumin sein soll. Man überzeugt sich von diesem Freisein.

Das Plasma reagiert frisch meist schwach alkalisch oder neutral, wird aber beim Stehen in Zimmertemperatur meist sauer.

Handelt es sich nicht um die Darstellung der von *v. Fürth* näher präzisierten Proteinkörper, so läßt sich ein Muskelplasma auch durch Extrahieren mit anderen Neutralsalzlösungen gewinnen. Man verwendet alsdann 12 bis 15%ige Ammoniumchloridlösung oder 5%ige Lösungen von Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat. Die Methodik bleibt in der Ausführung die oben beschriebene.

A. Darstellung und Trennung des Myosins und Myogens durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat (siehe S. 517, Note 1).

1. Myosin (= Paramyosinogen von *Halliburton*[2]). Man versetzt das albuminfreie Muskelplasma mit einer gesättigten Ammonsulfatlösung, und zwar so, daß auf 2 Teile Plasma 1·5 Teile Salzlösung kommen. Der entstehende Niederschlag setzt sich flockig ab. Die Flüssigkeit darüber wird abgegossen. Den Niederschlag löst man in einer verdünnten Kochsalzlösung, in der meist ein Teil ungelöst bleibt, und filtriert die Lösung ab. Das opaleszente Filtrat wird mit drei Vierteln seines Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wodurch das Myosin erneut gefällt wird. Nach dem Abtrennen von der überstehenden Flüssigkeit löst man den Niederschlag wieder in Wasser und fällt, falls eine Isolierung beabsichtigt wird, unter Denaturieren mit Alkohol. Das ausgefällte Myosin wird gut mit Wasser salzfrei gewaschen. Die genannten Manipulationen sind alle möglichst schnell durchzuführen, da sich das Myosin durch Spontangerinnung — sichtbar an der Trübung seiner Lösungen — in unlösliches Myosinfibrin verwandelt.

2. Myogen (= Myosinogen von *Halliburton*). Das ammonsulfathaltige Filtrat der eben genannten Myosinfällung wird auf eine Sättigung von 50% Ammonsulfat gebracht. Verzichtet man auf die Darstellung des Myosins, so setzt man von vornherein

[1]) *F. Bottazzi*: Chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften der Flüssigkeiten aus gestreiften und glatten Muskeln. Atti R. Acad. dei Lincei, Roma. (5.) **21**. II, 8, 493 (1913); ebenda. **22**. 52.

[2]) *W. D. Halliburton*: On muscle proteids... Journ. of phys. **8**. 331 (1887).

dem Muskelplasma das Eineinviertelfache seines Volums an gesättigter Ammonsulfatlösung zu und filtriert von dem entstehenden Niederschlag ab. Wenn das Filtrat dieses Niederschlages wirklich myosinfrei ist, so darf eine kleine Probe desselben, auf 50° erhitzt, keine Abscheidung mehr ergeben. Nunmehr sättigt man die Lösung durch Eintragen von feingepulvertem Ammonsulfat in Substanz, filtriert von dem gebildeten Niederschlag ab, wäscht diesen mit gesättigter $Am_2\ SO_4$-Lösung aus, preßt ihn ab und löst ihn in Wasser. Die klar filtrierte Lösung erhitzt man auf 40°, um dadurch lösliches Myogenfibrin zu beseitigen (siehe unten). Eventuell kann dann eine Umfällung mit Ammonsulfat vorgenommen werden. Aus der Lösung läßt sich das Myogen zuletzt mit Alkohol fällen, salzfrei waschen und unter Denaturierung mit Alkohol und Äther trocknen.

Lösliches Myogenfibrin findet sich nicht im frischen Muskelplasma der Warmblüter, wohl aber in älteren, ein- bis zweitägigen Plasmen, da es sich beim Stehen des Plasmas allmählich aus Myogen bildet. Im Muskelplasma der Kaltblüter (Fische und Amphibien) ist das lösliche Myogenfibrin ein präformierter Bestandteil.

Man fällt aus diesem Plasma das Myosin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Die von dem Niederschlag abfiltrierte Lösung wird auf 40° erwärmt. Das Auftreten einer Trübung oder Flockung zeigt die Anwesenheit des Myosinfibrins an.

B. Trennung des Myosins vom Myogen: *a*) durch Dialyse; *b*) durch fraktionierte Wärmekoagulation.

Ad *a*) Dialyse: Man füllt das albuminfreie Muskelplasma in Dialysenschläuche aus Pergament und dialysiert 12 bis 24 Stunden gegen laufendes, dann ebenso lange gegen destilliertes Wasser. Der entstehende Niederschlag, das Myosin, wird abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und eventuell nach Wunsch durch Erhitzen auf 45 bis 50° in Myosinfibrin verwandelt. Das Filtrat, welches Myogen (und lösliches Myogenfibrin) enthält, wird, wie oben beschrieben, weiter behandelt, eventuell sofort mit Alkohol gefällt.

Ad *b*) Fraktioniertes Auskoagulieren. Die genannten Eiweißkörper haben sehr verschiedene, miteinander nicht zusammenfallende Koagulationstemperaturen. Im Plasma gerinnt Myosin bei 47 bis 50°, Myogen gerinnt bei 55 bis 65° und lösliches Myogenfibrin bei 40°.

Es ist daher die Möglichkeit vorhanden, die verschiedenen Proteine durch Koagulieren in einem Muskelplasma nebeneinander präparativ, qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

Wir beschreiben sofort die quantitative Bestimmung, aus der die Bedingungen für die Methodik der Darstellung oder Trennung sowie für den qualitativen Nachweis klar hervorgehen:

Quantitative Bestimmung der Muskelproteine[1]).

Man erhitzt eine Probe von 10 *cm*³ frischen Muskelplasmas einige Zeit auf 100°. Die Menge des ausfallenden Koagulates stellt das Gesamteiweiß dar.

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamteiweiß empfehlen *Janney* und *Csonka*[2]) die Koagulation mit siedendem Alkohol.

Eine zweite Probe von 10 *cm*³ wird während fünf Minuten auf 40° erhitzt. Es koaguliert das präformierte, lösliche Myogenfibrin.

10 *cm*³ werden während fünf Minuten auf 50° erhitzt. Es fällt das Myosin + lösliches Myogenfibrin aus.

Eine vierte Probe, auf 70° erhitzt, enthält Myosin und das Myogen als unlösliches Myosin- bezw. Myogenfibrin.

Zum Zweck gleichmäßiger Gerinnungsbedingungen bringt man die einzelnen fünf Proben in gleich große Zentrifugengläschen von gleicher Wandstärke und taucht sie in ein auf die gewünschte Temperatur gebrachtes Wasserbad ein. Die Temperatur kontrolliert man mit einem Thermometer, das nicht in eine der Proben selbst, sondern in ein sechstes, mit Wasser gefülltes Röhrchen eintaucht. Natürlich muß auch die Badetemperatur direkt am Thermometer gemessen werden. Die Temperaturschwankungen dürfen bei gutem Umrühren im Wasserbad 1° nicht übersteigen.

Die Niederschläge werden dann in der Zentrifuge dekantiert, mit destilliertem Wasser unter Aufschwemmen und durch erneutes Zentrifugieren chlorfrei gewaschen. Die Waschwasser schickt man zur Sicherung vor Verlusten durch vorher gewogene Filter und spült schließlich die Niederschläge quantitativ auf die Filter; dann wäscht man mit Alkohol und Äther nach, trocknet bei 110° und wägt nach dem Erkalten.

Die Tabelle gibt die Resultate für ein normales Kaninchenmuskelplasma wieder (*Steyrer*).

---

[1]) *H. Steyrer*: Ein Beitrag zur Chemie des entarteten Muskels. *Hofmeisters* Beitr. **4**. 234 (1904).

[2]) *N. W. Janney* und *F. A. Csonka*: Quantitative Bestimmung des Gesamtproteins und der Nichtproteinkörper des Muskels. Journ. of Biol. Chem. **22**. 195 (1915); **25**. 177 und 185 (1916).

In 10 cm^3 Plasma		Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Proz. des Ges.-Eiweiß	Myosin: Myogen
Gesamteiweiß	100°	0·3623	100	—
Myosin + Myogen . . .	70°	0·3490	96·33	—
Myosin	50°	0·0637	18·78	18:78
Lösliches Myogenfibrin .	40°	0·0061	1·68	—
Albumin	—	—	3·67	—

Die absoluten Mengen der Muskelproteine lassen sich durch Substraktion einer Fraktion der Tabelle von der nächsthöheren der Tabelle bestimmen, das eventuell vorhandene Albumin resultiert aus der Differenz der letzten Koagulationsfraktion (70°) vom Gesamteiweiß (100°). Für die qualitative oder präparative Bestimmung verfährt man so, daß man hintereinander auf 40, 50 und 70° erhitzt und vor jeder Koagulation bei der nächsthöheren Temperatur von dem abgeschiedenen Koagulat abfiltriert.

3. Myoproteid ist ein Körper, der im Muskelplasma der Warmblüter nicht vorkommt. Er findet sich mit Sicherheit nur im Fischmuskel (siehe S. 522, Note 1).

Darstellung: Aus blutfreien Muskeln des Karpfens oder aus käuflichem Fleisch von Seefischen, aus denen genau wie aus Warmblütermuskeln ein Plasma hergestellt wird.

Man versetzt das Plasma vorsichtig mit verdünnter Essigsäure bis zu eben saurer Reaktion und kocht dann zehn Minuten lang. Nach dem Abfiltrieren von dem entstandenen Koagulum bleibt ein klares, goldgelbes Filtrat, das nach dem Abkühlen mit Essigsäure zu stark saurer Reaktion versetzt wird. Das weiße, flockig ausfallende Proteid läßt man absetzen und dekantiert es wiederholt mit Wasser. Dann löst man in verdünnter Ammoniaklösung, fällt wieder mit Essigsäure, filtriert und löst nach gutem Abpressen mit verdünnter NH_3-Lösung. Hierauf neutralisiert man die Lösung mit Essigsäure, fällt mit Alkohol und behandelt den abfiltrierten Niederschlag mit heißem Wasser, Alkohol und Äther.

4. Das Nukleoproteid der quergestreiften Muskeln (*Pekelharing*[1]).

Man tötet das Tier (Hund, Kaninchen) durch Verbluten und durchspült von der Aorta abdominalis mit physiologischer Kochsalzlösung. Läuft die Spülflüssigkeit klar und farblos aus der Vene ab, so präpariert man die Muskeln der unteren Extremitäten frei von Fett und Bindegewebe und zerhackt sie fein. Darauf extrahiert man mit 0·15%iger Na_2CO_3-Lösung. Die Extrakte, die nach einigen

[1]) *C. A. Pekelharing*: Über das Vorhandensein eines Nukleoproteids in den Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22. 245 (1897).

Stunden aus den Muskeln durch geringen Druck ausgepreßt werden (etwa 1 *l* auf 500 *g* Fleisch), werden durch Filter gesaugt und bis zu ziemlich stark saurer Reaktion mit Essigsäure versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag, der in der Zentrifuge von der Flüssigkeit getrennt und aus sehr verdünnter NH_3-Lösung mit Essigsäure umgefällt wird. Der Körper wird wiederum in der Zentrifuge ausgeschleudert, abfiltriert und erst mit 85%igem, dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Ausbeute aus 543 *g* Fleisch: 2 *g* lufttrockenes Proteid.

Der Gehalt an Phosphor beträgt 0·7%, Asche 0·46%.

Der Körper, der, wie die Nukleoproteide mit Pepsinsalzsäure behandelt, ein säureunlösliches Nuklein abspaltet, enthält Alloxurbasen. Identifiziert ist nur das Guanin. Das Nuklein enthält 3·5% Phosphor.

Die Beziehung dieses Proteides zu dem Myoproteid *v. Fürths* ist nicht festgestellt. Vielleicht sind beide Körper identisch.

V. Proteine der glatten Muskelzellen.

Es liegen Untersuchungen von *Velichi*, *Capelli*, *Vincent*, *Lewis* und *v. Fürth* vor. Methodisch bieten die Untersuchungen nichts Neues im Vergleich zu den bereits genannten Darstellungsmethoden.

Die Prinzipien sind die einer Extraktion des Muskelmagens vom Schwein, von der Gans oder vom Schaf, von Uterusmyomen, von Stichopusarten (Seewalze) und von Zephalopoden[1]) mit physiologischer Na Cl-Lösung und Trennung durch Dialyse in ein fällbares Globulin und ein gelöstes Albumin (?) oder fraktioniertes Koagulieren oder Fällen mit $Am_2 SO_4$ nach *v. Fürth*. Die technischen Details solcher Untersuchungen sind die sub II *a*, *b* beschriebenen (S. 519).

Die isolierten Fraktionen stimmen nicht mit den durch *v. Fürth* so gut definierten Proteinen der quergestreiften Muskeln überein.

VI. Sonstige Albumine und Globuline.

Wir sind bisher in der Besprechung der nicht kristallisierenden tierischen Proteine so vorgegangen, daß wir nicht die Reihenfolge der üblichen Proteinsystematik eingehalten haben. Wir haben es vorgezogen, die Besprechung an der Hand von einigen Körperflüssigkeiten durchzuführen. Die Berechtigung hiezu glauben wir darin zu finden, daß diese Gewebssäfte hinsichtlich der in ihnen vorkommenden Proteine wohl am besten erforscht sind und daß wir auch annehmen dürfen, daß die in ihnen enthaltenen Proteine

[1]) *O. v. Fürth*: Über die Eiweißkörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehungen zur Wärmestarre. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 238 (1900).

endgültig qualitativ und quantitativ bestimmt sind. Es fällt dabei auf, daß wir es hier mit Flüssigkeiten oder mit Organen zu tun haben, die in ihrem Proteingehalt sehr konstant zusammengesetzt sind (Serum, Eier, Milch).

Bei weitem geringere Erfolge weist die Forschung im Studium der Organ- und Zelleiweiße auf. Wir müssen gestehen, daß wir heute noch nicht imstande sind, etwa chemisch von einem Organeiweiß, d. h. etwa von einem speziellen Lebereiweiß oder Niereneiweiß zu sprechen. Wir wissen nur, daß in den Organen und in einigen Sekretprodukten drüsiger Organe oder in unseren Stützgeweben noch eine Reihe von Eiweißkörpern vorkommen. In der Besprechung dieser Proteinsubstanzen müssen wir uns aber an die alte, klassische Systematik der Proteine halten. Denn wir können von diesen Proteinen nur sagen, daß sie auf Grund dieser oder jener Eigenschaften in diese oder jene Proteingruppe einzuordnen sind, nicht aber, daß sie etwa die speziellen Eigenschaften einer Organzellart aufweisen.

Der Besprechung dieser Körper schließen wir in einem Anhang die Abhandlung jener Proteinsubstanzen an, die durch sekundäre Veränderung genuiner Proteine, einerlei welcher Klasse und Herkunft, entstehen, d. h. die eiweißartigen, künstlichen Umwandlungsprodukte der Proteine.

Albumine. Außer den bereits genannten Albuminen in Serum, Chylus, Milch und Ei sind keine weiteren albuminartigen Proteine bekannt.

Gruppe der Globuline. Außer den genannten Globulinen im Blut, Ei, Milch, Kolostrum und Muskel sind eine ganze Reihe von Zellglobulinen isoliert. Wir erwähnen die Darstellungsmethode solcher Globuline, fügen aber hinzu, daß ihre Präexistenz im Gewebe nicht garantiert ist und daß die Spezifität und Einheitlichkeit solcher Körper bis jetzt ganz unbewiesen geblieben ist.

Generelle Darstellungsmethode der **Zellglobuline.**

Darstellung nach *Halliburton*[1]): Die Niere oder Leber wird in situ post mortem von der Aorta abdominalis aus mit 0·6%iger Kochsalzlösung blutfrei gespült. Die Organe werden hierauf fein zerkleinert und mit 5%iger Magnesiumsulfatlösung kalt extrahiert. In den kalten Extraktlösungen kann man sich durch fraktionierte Bestimmung von Koagulationstemperaturen über die Zahl und vielleicht auch über die Natur der in ihnen gelösten Proteine

[1]) *W. D. Halliburton*: The proteids of kidney and liver cells. Journ. of physiol. **13**. 808 (1880).



orientieren, auch durch Versuche der Salzfällung die Fällungsgrenzen dieser Körper genauer festlegen.

Nach *Pohl*[1]): Man befreit das zu verarbeitende Organ nach Möglichkeit von Blut, indem man es in situ von den zuführenden Arterien aus so lange mit 0·8%iger Kochsalzlösung durchspült, bis die Spülflüssigkeit aus den abführenden oder entfernteren Venen farblos abläuft.

Bei der Leber z. B. schickt man die Lösung rückläufig durch die Vena cava ascendens und läßt durch die abdominellen Gefäße ablaufen, indem man temporär die Gefäße am Leberhilus, die Venae gastroduodenales und die Cava ascendens mit Klammern verschließt, um die Flüssigkeit vorübergehend zu stauen. Das ganz entblutete Organ zerkleinert man zu einem feinen Brei und schüttelt diesen nach Toluolzusatz tüchtig mit 0·8%iger Na Cl-Lösung durch. Nach 24stündigem Stehen in der Kälte wird durch Filtration ein Plasma gewonnen, das nach wiederholtem Zurückgießen der ersten Filtratportionen klar und durchscheinend ist, neutral reagiert und die Farbe von Blutserum hat.

Das Verhalten dieser Eiweißlösung gegen Neutralsalze spricht für einen Gehalt an Globulinen, ohne daß es bisher möglich wäre, verschiedene Organglobuline zu unterscheiden.

Zu ihrer Darstellung säuert man mit 0·1 bis 0·2%iger Essigsäure schwach an. Es entsteht sofort ein (im Säureüberschuß unlöslicher!) Niederschlag. Dieser Niederschlag kann zur Reinigung in verdünnten Alkalien gelöst werden. (Im Gegensatz zur Globulinnatur ist der Körper in Neutralsalzlösungen unlöslich!) Durch erneuten Säurezusatz wird das Organeiweiß wieder gefällt. Da Spontangerinnungen der Lösungen leicht eintreten, so ist schnelles Arbeiten angezeigt.

Eine Fraktionierung dieser Globuline, etwa durch Dialyse, gelingt nicht. Die Lösungen trüben sich bei wochenlangem Dialysieren, verlieren die Fähigkeit, bei 40° zu koagulieren und werden unfällbar durch Salzsäure (Gegensätze zu echten Globulinen).

Elementarzusammensetzung eines Leberglobulins der Pferdeleber:

C 47·21 bis 48·43, N 16·35, H 6·79, S 0·99, P 1·3, Fe + %.

Der Phosphorgehalt schwankt zwischen 0·28 bis 1·3%.

Globuline der Kristallinse: α- und β-Kristallin.

Darstellung eines Plasmas durch Wasserextraktion der Linse nach *Mörner*[2]). Die Linsen (zirka 30 *g*) werden mit destilliertem

[1]) *J. Pohl*: Über Organeiweiß. *Hofmeisters* Beitr. **7**. 381 (1906).

[2]) *C. Th. Mörner*: Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**·61 (1894).

Wasser oder $^1/_4$-gesättigter Kochsalzlösung (10 cm^3 auf 1 g Linsensubstanz) in einer Flasche geschüttelt. Nach eineinhalbtägigem Schütteln haben sich alle Linsenfasern in Wasser aufgeschwemmt. Die nicht zerstörten Linsenkerne werden in einer Reibschale zerdrückt. Dann wird das Schütteln fortgesetzt, bis die ganze Linsenmasse gleichmäßig im Wasser verteilt ist. Nach Verlauf eines Tages hat sich die Hauptmasse der Fasern zu Boden gesenkt. Die überstehende Flüssigkeit wird abfiltriert. Der Bodensatz wird dann wiederholt noch so oft in der beschriebenen Weise mit der Salzlösung zur Extraktion geschüttelt, bis die Filtrate keine *Heller*sche Eiweißprobe mehr geben.

Das Ungelöste wird zur Isolierung von Albumoiden verwandt.

Das Linsenplasma, das auf Globuline verarbeitet werden soll, wird zweckmäßig mit W a s s e r, nicht mit Kochsalzlösung hergestellt.

1. α-K r i s t a l l i n: Man stellt das Extrakt in der beschriebenen Art aus der ganzen Linse oder nur aus ihrer äußeren Hälfte dar.

Das klar filtrierte Extrakt wird mit Essigsäure gefällt, so daß die Mischung 0·02 bis 0·04% an Essigsäure enthält. Der feinflockige Niederschlag wird abfiltriert, was leicht geschieht. Dann läßt man eine zwei- bis dreimalige Umfällung durch Lösen in 0·01%igem Ammoniak und Fällen mit äußerst verdünnter Essigsäure folgen.

Die letzte Fällung wird auf dem Filter mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet. Zur Ausführung von Reaktionen wird der Körper vor der Alkoholbehandlung zu neutraler Lösung in äußerst verdünntem Ammoniak gelöst.

2. β-K r i s t a l l i n wird aus den Wasserextrakten der inneren Linsenteile dargestellt. Durch Schütteln in der oben beschriebenen Weise wird drei Viertel bis vier Fünftel der Linsenmasse erst entfernt; die Linsenkerne werden dann abfiltriert und genau in der beschriebenen Weise getrennt weiter verarbeitet. Die Reinigung des mit Essigsäure gefällten Körpers geschieht durch Umfällen oder Alkoholzusatz.

Eigenschaften. Die Kristalline verhalten sich gegen $Am_2 SO_4$ oder $Mg SO_4$ wie echte Globuline. Abweichend von Globulineigenschaften ist die Erscheinung, daß sie aus ihrer Lösung weder durch Verdünnung noch durch Ganzsättigung mit Kochsalz fällbar sind.

α-Kristallin: C 52·83, H 6·94, N 16·68, S 0·56%.
$(\alpha)_D$ = — 46·9° (in 3·29%iger Lösung).
Koagulationstemperatur: 73° in 1·35%iger Lösung.

β-Kristallin: N 17·4, S 1·27. Koagulationstemperatur 63°.
$(\alpha)_D$ = — 43·1 bis 43·3 (in 1·80 bis 3·12%iger Lösung).

Das Totaleiweiß der Linse besteht aus 32% β- und 19·5% α-Kristallin neben 0·5% Albumin und 48% Albumoid.

Globulin der Thyreoidea. Thyreoglobulin ist ein natürliches Halogeneiweiß mit Globulineigenschaft. Durch Säurehydrolyse läßt sich aus ihm das Jodothyrin gewinnen.

Darstellung nach *Oswald*[1]): Als Ausgangsmaterial wählt man am besten Schilddrüsen vom Schwein (da die Thyreoglobuline verschiedener Tiere nicht den gleichen Gehalt an Jod aufweisen, so muß man, wenn man etwa später die Darstellung einer größeren Menge Jodothyrins erstrebt, eine möglichst jodreiche Drüse verarbeiten. Am reichsten jodhaltig ist das Globulin des Ochsen, 0·86%, am ärmsten das des Hammels, 0·39%. Innerhalb derselben Tierart schwankt der Jodgehalt mit der geographischen Verbreitung des Tieres und mit dem physiologischen Zustand der Drüse).

Die frische, fettfrei präparierte Schilddrüsenmasse wird fein zerhackt, im Mörser mit Quarzsand zerstoßen und hierauf mit physiologischer Kochsalzlösung angerührt. Den dünnen Brei läßt man nach Zusatz von etwas Thymol in Substanz oder in alkoholischer Lösung 24 Stunden im Eisschrank stehen. Alsdann koliert man durch ein Tuch und versetzt das rötliche, trübe Extrakt mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung. Der entstehende Niederschlag setzt sich nach einiger Zeit zu Boden, wird auf einem Filter gesammelt, mit halbgesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung gewaschen, bis seine rötliche Farbe in eine graue Farbe umgeschlagen ist. Dann löst man in Wasser und filtriert die trübe Lösung durch zahlreiche Faltenfilter. Jedem Trichterinhalt setzt man etwas Thymol zu. Die ersten trüben Filtratanteile werden wieder auf den Trichter gebracht. Da die Filterporen meist verstopfen, kürzt man das langwierige Filtrieren, indem man die Filter täglich erneuert. Es dürfen zur weiteren Verarbeitung nur unbedingt klare, zellfreie Filtrate verwandt werden.

Zu den vereinigten Filtraten setzt man das gleiche Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung. Der jetzt schneeweiße, sich bald zusammenballende Niederschlag dieser Fällung wird auf einem Seidenfilter gesammelt, alsdann in Wasser gelöst, bis zur Schwefelsäurefreiheit der Lösung dialysiert, hierauf mit 96%igem Alkohol aus seiner Lösung gefällt. Der Körper wird dann auf Seidenfilter gesammelt und mit Alkohol und Äther nachbehandelt.

Die Extraktion des Thyreoglobulins gelingt gut durch dreimaliges, je zirka halbstündiges Ausschütteln des fein zerkleinerten Materials mit physiologischer Na Cl-Lösung auf der Schüttelmaschine. Die Flüssigkeit wird koliert, abgepreßt und dann unter schwacher

[1]) *A. Oswald*: Die Eiweißkörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**. 64 (1899); Zur Kenntnis des Thyreoglobulins. Ibid. **32**. 121 (1901).

Saugwirkung durch eine mit Papierwolle gefüllte Nutsche (Papier mehrfach wechseln!) gesaugt. Das klare Filtrat wird nun durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt; der Niederschlag wird abzentrifugiert, im Zentrifugengefäß mehrfach mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung aufgenommen und wieder ausgeschleudert; schließlich wird das Thyreoglobulin in destillietem Wasser gelöst und durch zwei- oder dreimaliges Umfällen gereinigt. Die Niederschläge werden jeweils auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Aus der salzfrei dialysierten Lösung fällt das Protein durch Azetonzusatz im Verhältnis 1 : 4 quantitativ[1]).

Anstatt der Ammonsulfatlösung läßt sich das Thyreoglobulin aus den klaren Drüsenextrakten auch mit Essigsäure füllen. Man setzt solange verdünnte Essigsäure zu, bis der entstehende Niederschlag flockig wird. (Ein Säureüberschuß ist zu vermeiden!) Der auf einem Seidenfilter gesammelte Niederschlag wird aus seiner Lösung in sehr verdünntem Alkali (1 Teil Na OH auf 1000 Teile Wasser) abermals mit Essigsäure gefällt, mit angesäuertem Wasser dekantiert, auf dem Filter gesammelt und getrocknet.

Das Filtrat der erstmaligen Fällung dieses Globulins wird zur Verarbeitung auf das Nukleoproteid der Thyreoidea verwendet.

Eigenschaften. Der Körper hat in seinem Verhalten gegen Salzlösungen Globulineigenschaften, verhält sich aber insofern abweichend, als er aus seinen mäßig salzhaltigen Lösungen durch Zusatz verdünnter Säuren ausfällt.

Bei langandauernder Dialyse gegen destilliertes Wasser fällt Thyreoglobulin nicht aus.

Koagulationstemperatur 65° in einer 10%igen $Mg\,SO_4$-Lösung, in salzfreier Lösung tritt keine Hitzekoagulation ein. Der Körper enthält eine Kohlehydratgruppe, die keine Pentose ist.

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 52·01, H 6·93, N 16·61, S 1·95 (O 20·85), Asche 0·42 bezw. C 51·96, H 6·68, N 16·54, S 1·77, Asche 0·47%.

Der Jodgehalt des Thyreoglobulins schwankt bei verschiedenen Tierarten von 0·23 bis 0·86% [2]).

Darstellung von Jodothyrin (Thyreojodin) direkt aus der Schilddrüse (*Baumann*[3]). Man kocht am besten Hammel-

[1]) Vgl. *Eduard Strauss*: Ein Versuch zur Anreicherung der Schilddrüse an Jod. Zeitschr. f. physiol. Chem. 104. 133 (1919).

[2]) Vgl. *F. Blum* und *R. Grützner*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**. 418 (1914).

[3]) *E. Baumann*: Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**. 319 (1895); *E. Baumann* und *E. Roos*: ibid. **21**. 481 (1896); ferner **22**. 1 (1896); *E. Roos*: Über die Wirkung des Thyreojodins. Ibid. **22**. 16 (1896).

schilddrüsen oder stark jodhaltige Strumen während 15 Stunden mit 10%iger Schwefelsäure. 4 Gewichtsteile Säure auf 1 Teil Drüsengewebe. Aus der abgekühlten Lösung wird das Fett mechanisch oder durch Kolieren entfernt. Der in der Lösung befindliche flockige Jodothyrinniederschlag wird auf dem Filter gesammelt. Ausbeute 0·75 bis 1·5% des Drüsengewichtes. Durch Einengen des in seiner sauren Reaktion abgestumpften Filtrates, noch besser nach Entfernen der Schwefelsäure mit Bariumkarbonat werden noch geringe Mengen Jodothyrin ausgefällt. Die vereinigten feinsten Niederschläge werden wiederholt mit 90%igem Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Extrakte werden eingedunstet. Der Rückstand wird mit der zehnfachen Menge Milchzucker zerrieben und mit Petroläther, dann mit einem Gemenge von wasserfreiem Äther mit Petroläther ausgezogen. Nach Entfernung des Milchzuckers mit der siebenfachen Menge heißen Wassers wird in Na OH gelöst (5%ig) und mit Essigsäure gefällt. Lösung und Fällung werden wiederholt.

Elementarzusammensetzung: C 58·2, H 7·4, N 8·9, S 1·4, J 14·3, Asche 0·4%.

Ein dem Thyreojodin *Baumanns* ähnlicher, vielleicht mit ihm identischer Körper läßt sich durch Hydrolyse von Thyreoglobulin nach *Oswald*[1]) isolieren.

Die Einheitlichkeit und Reinheit beider Körper ist nicht gesichert.

Gruppe der Nukleoalbumine.

Man bezeichnet mit diesem Namen globulinähnliche Proteine, die durch den Gehalt an Phosphor, einige wenige auch durch den Gehalt einer Kohlehydratgruppe ausgezeichnet sind. Der Begriff Nukleoalbumine ist scharf von dem der Nukleoproteide zu trennen, denn es fehlt den ersteren das Charakteristische der letzteren, die im Molekül enthaltenen Purinbasen.

Da man aus einer Anzahl von Nukleoalbuminen durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure oder durch andere gelinde hydrolytische Mittel einen in verdünnten Säuren und Wasser unlöslichen Körper gewinnen kann, der in seinen äußeren Eigenschaften an das aus den echten Nukleoproteiden unter gleichen Bedingungen entstehende Nuklein bezw. an die aus diesem hervorgehende Nukleinsäure erinnert, so bezeichnete man die Nukleoalbumine auch als Paranukleoproteide und jene abspaltbaren Körper als Para- oder Pseudonukleinsäure bezw. Paranuklein. glaubte man in dem Entstehen eines solchen Paranukleins eine für

[1]) *A. Oswald*: Die Eiweißkörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**. 14 (1899); Zur Kenntnis des Thyreoglobulins. Ibid. **32**. 121 (1901).

die Körperklasse der Nukleoalbumine charakteristische Eigentümlichkeit zu erkennen. Die Bezeichnung „Nukleoalbumin“ ist eine unglückliche, und die angebliche Spezifität der Paranukleine ist nicht vorhanden.

Der Aufbau eines Nukleoalbumins aus einer Nukleinsäure bezw. einem Nuklein und einer Eiweißkomponente im Sinne einer proteidartigen Bindung ist ganz unbewiesen. Man täte gut, den Namen Nukleoalbumine, der durch das Wort „Nukleo“ zu Verwechslungen führen könnte, ganz durch das Wort Phosphoglobulin zu ersetzen (*Cohnheim*). Enthält ein solches Globulin auch ein Kohlehydrat, so spricht man von einem Glykophosphoglobulin.

Wie wir die durch Spaltung der „Nukleoalbumine“ entstehenden „Paranukleine“ auffassen sollen, ist noch unentschieden. Wir können in diesen Substanzen nur besonders geartete, komplizierte Bruchstücke des ursprünglichen Proteins sehen, deren Zusammensetzung offenbar von der Darstellungsmethode, d. h. dem angewandten hydrolytischen Agens und der Intensität seiner Wirkung mehr abhängig ist als von der verarbeiteten Muttersubstanz selbst.

Die Feststellung eines Proteins als Nukleoalbumin geschieht durch den Nachweis des Phosphorgehaltes bei gleichzeitigem Fehlen von Purinbasen nach vorangegangener Hydrolyse. Wichtig ist ferner, daß Nukleoalbumine in neutraler Lösung, d. h. die Salze der Nukleoalbumine, in der Hitze nicht koagulieren.

Das Entstehen eines Paranukleins unter Pepsinsalzsäurewirkung kann ebenfalls zur Identifikation verwertet werden. Das Ausbleiben einer solchen Paranukleinbildung spricht aber nicht gegen die Nukleoalbuminnatur.

Alle übrigen Eigenschaften der Löslichkeit in Alkali, Fällbarkeit mit verdünnten Säuren sind für eine Feststellung nicht verwendbar, da die Nukleoalbumine in dieser Beziehung sich wie manche Nukleoproteide oder Mukoide verhalten. Die Abgrenzung von den letzteren, deren Alkalisalzlösungen keineswegs immer schleimig und fadenziehend sind, ist bisweilen schwierig oder unmöglich, da es ja auch kohlehydrathaltige Nukleoalbumine (Ichthuline) gibt, ebenso wie auch phosphorhaltige Mukoide (Helikoproteid) existieren.

1. Nukleoalbumin aus Rindergalle (sogenanntes Gallenmuzin).

Darstellung nach *Paijkull*[1]): Rindergalle wird mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols gefällt. Unmittelbar nach vollzogener Fällung wird zentrifugiert. Nach zehn Minuten hat sich ein Niederschlag abgesetzt, so daß man die überstehende Lösung abgießen kann. Der zu einem festen Klumpen zusammengeballte Bodensatz wird herausgenommen, mit Filtrierpapier oberflächlich getrocknet und in Wasser gesteckt. Es entsteht schnell eine opalisierende, schleimig fadenziehende Lösung. Zur Befreiung von gallensauren Salzen fällt man den Körper aus seiner Lösung abermals mit absolutem Alkohol, trennt in der Zentrifuge und löst wieder in Wasser.

Aus dieser wässerigen Lösung fällt man den Körper durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Essigsäure (kein Überschuß!) und dekantiert den Niederschlag gut mit Wasser; dann löst man mit Hilfe von wenig Alkali bis zu neutraler Reaktion und fällt von neuem mit Essigsäure. Dieses Lösen und Fällen wird ein zweitesmal wiederholt. Die zuletzt entstehende, möglichst konzentrierte Lösung wird mit viel Alkohol unter Zusatz von ein wenig Essigsäure gefällt. Der Niederschlag wird dann wochenlang mit 50%igem Alkohol in zu erneuernden Mengen digeriert, bis in dem farblosen Waschalkohol keine Gallensäuren mehr vorhanden sind. Danach trocknet man mit Äther und zuletzt im Vakuum bei 110°.

Das fragliche Nukleoalbumin läßt sich auch aus der Gallenblasenschleimhaut selbst darstellen. Man befreit die abpräparierte Mukosa durch Waschen von anhaftender Galle und extrahiert die Schleimsubstanz, indem man die unbeschädigte innere Oberfläche der Schleimhaut zwei Tage lang mit Wasser in Kontakt beläßt. Die aus solchen Extrakten dargestellte Substanz ist reiner als das immer noch gelblich gefärbte Präparat aus der Galle selbst.

Eigenschaften. Der Körper hat in seinem Verhalten zu Alkalien und Säuren Muzineigenschaften. Es fehlt ihm aber die für Muzine charakteristische Kohlehydratgruppe. Auch enthält derselbe Phosphor und liefert mit Pepsinsalzsäure ein phosphorreiches Nuklein.

Elementarzusammensetzung: C 50·89, H 6·7, N 16·14, S 1·66%. Der Körper koaguliert in salzfreier Lösung nicht, wohl aber nach Zusatz einer Spur Essigsäure.

2. Dem sogenannten Nukleoalbumin der Galle schließt sich hier eine kleine Zahl von Körpern an, die, wie die vorbeschriebene Substanz, große äußere Ähnlichkeit mit Muzinen bezw. mit Mukoiden haben, die aber durch ihren Phosphorgehalt und die Erscheinung

[1]) *L. Z. Paijkull*: Über die Schleimsubstanz der Galle. Zeitschr. f. physiol. Chem. **12**. 196 (1887).

der Abspaltung eines phosphorreicheren Paranukleins der bisher gültigen Definition eines Nukleoalbumins gerecht werden. Das Interesse, das diesen Körpern gebührt, ist kein geringes, da wir dieselben meist im Gefolge pathologischer entzündlicher Prozesse in kreten und Exsudaten auftreten sehen (Harn, Trans- und Exsudate, Synovia). Die Darstellungsweise dieser Substanzen aus Synovia (*Hammarsten*), Transsudaten (*Paijkull*), Blasenschleimhaut und Niere (*Lönnberg*) ist einheitlich. Man stellt aus den zerkleinerten Organen kalte oder heiße Wasser- bezw. Alkali- (0·05 bis 0·1%ige) Extrakte dar und fällt in diesen die muzinähnlichen Körper mit verdünnter Essigsäure. Durch wiederholtes Lösen in ganz verdünntem Alkali und Fällen mit Essigsäure in der oben wiederholt beschriebenen Weise kann man eine Reinigung der Substanz erstreben.

Die Identifikation mit einem sogenannten Nukleoalbumin kann stets nur eine indirekte sein, indem man das Bestehen eines Nukleoproteides durch den negativen Ausfall des Purinbasennachweises und das eines Muzins durch das Fehlen einer reduzierenden Komponente nach vorangegangener Hydrolyse mit 0·3%iger Salzsäure feststellt. Das Auftreten eines „Nukleins" bei der Spaltung mit Pepsinsalzsäure, das sich aus allen „Nukleoalbuminen", aus den genannten Körperflüssigkeiten und Organen isolieren ließ, ist kein definitives Beweismittel für die chemische Natur oder wenigstens chemische Rangordnung des fraglichen Körpers.

Die sogenannten **Para- oder Pseudonukleine** der Nukleoalbumine. Generelle Darstellungsmethoden. Man versetzt eine Lösung der zu prüfenden Substanz oder den ungelösten Körper am besten mit einem wirksamen natürlichen Hundemagensaft oder mit einer Mischung von 0·2%iger Salzsäure mit wirksamem käuflichen Pepsin. Das Gemisch oder die Lösung bleibt einige Zeit bei 37° im Brutschrank stehen. (Um zu gleichmäßig zusammengesetzten Körpern zu kommen, wird man wohl stets gleichlange Verdauungszeiten und Konzentrationsbedingungen einhalten, da die Paranukleine keineswegs absolut fermentresistent zu sein scheinen; so sah *Salkowski* bei Verdauung von 1 Teil Kasein mit 500 Teilen Verdauungslösung alles Paranuklein verschwinden, unter Abspaltung des in ihm enthaltenen Phosphors als Phosphorsäure.) Man filtriert nach einer geraumen Zeit den am Boden befindlichen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser aus und unterwirft ihn unter Umständen nochmals einer Verdauung. Alsdann filtriert man das Ungelöste ab und wäscht es bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in den Waschflüssigkeiten mit Wasser aus. Man reinigt durch wiederholtes Lösen in einer zur Lösung eben ausreichenden Menge von stark verdünntem Alkali und erneutes Fällen mit ver-

dünnten Säuren. Die letzten Fällungen werden auf dem Filter aufeinanderfolgend mit heißem Wasser, Alkohol und Äther behandelt.

Der quantitative Nachweis eines Paranukleins geschieht durch den Nachweis des Phosphors, das Fehlen von Nukleinbasen und reduzierender Komponenten in den Zersetzungsflüssigkeiten nach Zerkochen mit Salzsäure.

Eventuell beigemengte echte Nukleine können von Paranukleinen dadurch getrennt werden, daß man mit kaltem Barytwasser behandelt. In diesem gehen nur die Paranukleine in Lösung. Aus der Lösung fällt man wieder mit verdünnter Säure und reinigt durch energisches Waschen von den Barytsalzverunreinigungen.

Paranukleine sind dargestellt aus Kasein, Vitellin, Ichthulin und den muzinähnlichen Sekret- und Gewebsnukleoalbuminen.

Paranukleinsäure. Unter dem Einfluß lange dauernder Ferment(Pepsin)-hydrolyse oder direkt durch gelinde Hydrolyse mit kaltem Ammoniak können einzelne Nukleoalbumine noch tiefer gespalten werden, wobei neben Albumosen, Peptonen (und Paranuklein) eine Substanz entsteht, die den Namen Paranukleinsäure führt. Der Name ist in Analogie zu dem Zerfall echter Nukleine in Nukleinsäure und Albumosen gewählt und basiert auf der Vorstellung, daß auch Paranuklein sekundär in die besagte Säure und weitere Albumosenbruchstücke zerfallen sollte. Diese Anschauung ist im ganzen wenig begründet, vor allem ist es unbewiesen, ob dieser als Paranukleinsäure bezeichnete Komplex ein primäres Spaltprodukt des „Nukleoalbumins" oder erst ein sekundäres über den Weg des Paranukleins gebildetes Hydrolysenprodukt darstellt.

I. Paranukleinsäure aus Kasein. Darstellung nach *Salkowski*[1]): Man versetzt Caseinum technicum oder purissimum (30 *g*) mit 1 *l* 0·2%iger Salzsäure, in der man vorher 2·5 *g* Pepsin gelöst hat, und schüttelt mehrere Stunden in der Schüttelmaschine. Durch Filtration dieser Emulsion gewinnt man ein klares Filtrat, das man mit 0·2%iger Salzsäure auf 2 *l* auffüllt und bei 40° der Verdauung überläßt. Man kann die Verdauung bereits nach 48 Stunden unterbrechen (die Abscheidung eines unlöslichen Nukleins ist weder 48 Stunden noch nach Monaten zu beobachten). Das klare Filtrat stumpft man mit Natronlauge oder Natriumkarbonat zu ganz schwach saurer Reaktion ab und dampft zur Hälfte auf dem Wasserbad ein. Dann neutralisiert man ganz und filtriert. Enthält das Filtrat freie Phosphorsäure, d. h. entsteht

[1]) *E. Salkowski*: Über die Paranukleinsäure aus Kasein. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 245 (1901).



in einer Probe mit NH_3 und $Ca\,Cl_2$ eine Fällung, so versetzt man das ganze Filtrat mit $Ca\,Cl_2$ und NH_3, filtriert vom Gefällten Kalziumphosphat ab und neutralisiert aufs neue. Die möglichst genau neutralisierte Lösung, in der Menge von zum mindesten 1 *l*, wird mit 200 cm^3 einer 5%igen Ferriammonsulfatlösung versetzt. Die klare Lösung wird alsdann auf dem Wasserbad oder auf freier Flamme zum Sieden erhitzt. Unter Auftreten einer stark sauren Reaktion scheidet sich ein feinflockiger Niederschlag ab, der sich zusammenballt. Er wird abgesaugt, auf der Nutsche so lange mit warmem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser, mit H Cl und $Ba\,Cl_2$ geprüft, absolut klar bleibt, dann mit Alkohol und Äther entwässert.

Der feinste Eisenniederschlag wird mit 100 cm^3 Wasser in einer Reibschale zu einer Suspension zerrieben und bei Zimmertemperatur mit 80 bis 90 cm^3 0·5 n-Na OH durchgerührt. Es entsteht eine klare Lösung, die erhitzt wird. Sobald sich durch Umsetzung der paranukleinsauren Eisenverbindung mit Natronlauge Eisenhydroxyd abscheidet, filtriert man möglichst schnell heiß in einen Kolben ab, der drei Viertel der zur Sättigung der angewanndte Menge Natronlauge nötigen Essigsäure enthält, so daß in dieser sauren Lösung eine weitere Zersetzung der Nukleinsäure nicht zu befürchten ist. Eine Probe dieser Lösung muß, wenn die Umsetzung gelungen sein soll, mit $Ba\,(OH)_2$-Wasser alkalisiert, klar bleiben (Freisein von Phosphorsäure!). Nunmehr fällt man die saure Lösung mit Kupferazetat (5%ige Lösung), solange noch ein Niederschlag entsteht; den sich absetzenden Niederschlag wäscht man durch Dekantieren, bringt ihn in eine Reibschale und entkupfert ihn unter gleichzeitigem Umrühren mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat von Cu S wird durch einen Luftstrom von $H_2\,S$ befreit, auf dem Wasserbad auf 60 cm^3 eingeengt, filtriert und mit dem mehrfachen Volum absoluten Alkohols versetzt.

Die entstehende Fällung wird auf dem Filter mit Alkohol und Äther entwässert. Sie wird bei 110 bis 115° getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 42·73, H 7·03, N 13·40, P 4·18%. Der Körper gibt Biuretreaktion und ist durch Ammonsulfat fällbar.

Darstellung nach *Reh*[1]): Die klar filtrierte Verdauungslösung wird auf die Hälfte eingeengt und erneut filtriert. Die phosphorsäurefreie Lösung wird mit Essigsäure stark angesäuert und mit einer konzentrierten Lösung von Uranylazetat so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Nach vollständigem Absitzen

[1]) *A. Reh*: Über die Polypeptidphosphorsäure (Paranukleinsäure des Kaseins). *Hofmeisters* Beitr. **11**. 1 (1908).



filtriert man. Zur Reinigung wird der weiße gelatinöse Niederschlag in 10%iger Salzsäure gelöst und nach dem Filtrieren vom Ungelösten mit Uranylazetat und hierauf bis zu beginnender Trübung mit Natronlauge versetzt. Nun wird bis zu beendeter Fällung konzentrierte Natriumazetatlösung zugesetzt. Diese Prozedur wird mit dem jeweils abfiltrierten Uranniederschlag so oft wiederholt, bis die Filtrate nach dem Natriumazetatzusatz keine Biuretreaktion mehr geben. Der über einem gehärteten Filter auf der Nutsche gesammelte Niederschlag wird durch Auswaschen mit Wasser von Uransalzen und Azetaten befreit, auf Tonplatten getrocknet und zu einem gelblichen Pulver verrieben. Eine Umsetzung dieses Uransalzes in die freie Paranukleinsäure ist bisher nicht ausgeführt.

Elementarzusammensetzung: C 24·04, H 4·0, N 7·59, P 4·27, O 26·84, U 33·33%.

2. Paranukleinsäure aus Vogeleidotter, Avivitellinsäure nach *Levene* und *Alsberg*[1]).

Das rohe oder gereinigte Vitellin wird in Wasser aufgeschwemmt (für das Vitellin aus 100 Eiern genügen 400 *cm*³ Wasser) und mit dem halben Volumen einer 25%igen Ammoniaklösung versetzt. Das Gemisch bleibt zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Alsdann neutralisiert man langsam ohne Erwärmung mit Essigsäure (unter Zufügen von Eisstücken!). Nachdem die Reaktion neutral oder nahezu neutral ist, fällt man mit einem Überschuß einer gesättigten Pikrinsäurelösung (100 *cm*³) und säuert dann mit Essigsäure stark an. Die Filtrate dieser Fällung werden mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt. Der entstandene abfiltrierte Niederschlag wird in Wasser gelöst und mit Essigsäure angesäuert. In einer kleinen Probe dieser klaren Lösung bestimmt man die Menge 0·5% H Cl enthaltenden Alkohols, die als Zusatz nötig ist, um der Probe eine auf Kongo saure Reaktion zu geben. Entsprechend dieser Menge versetzt man die ganze Lösung der gesuchten Substanz mit der berechneten Menge salzsauren Alkohols (0·5%ig). Der gebildete Niederschlag wird auf dem Filter aufeinanderfolgend mit 50%igem, 80%igem und 95%igem Alkohol bis zur Chlorfreiheit gewaschen und hierauf mit kochendem Alkohol und Äther extrahiert.

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 32·31, H 5·58, N 13·13, P 9·88, S 0·33, Fe 0·57%.

3. Hämatogen. Der durch peptische Verdauung von rohem Eidotter gewonnene Körper scheint eine den Paranukleinen des Vitellins ähnliche Substanz zu sein. Die Analogie ist nicht nur durch die Bedingungen seines Entstehens aus einem Vitellin, sondern

[1]) *P. A. Levene* und *C. Alsberg*: Zur Chemie der Paranukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 543 (1900).

auch durch die Erscheinung begründet, daß dieses Hämatogen durch gelinde sekundäre Hydrolyse auch weiter in eine Paranukleinsäure gespalten werden kann (*Milroy*).

Darstellung aus Rohdotter (nicht aus Vitellin) nach *Bunge*[1]). Man befreit den Dotter von Eiweiß und extrahiert ihn mit Äther. Der ätherunlösliche Rückstand wird in 1°/₀₀ H Cl gelöst und so lange mit 1°/₀₀iger Salzsäure versetzt, bis eine leicht filtrierende, opalisierende Lösung entsteht. Das Filtrat bringt man auf einen Gehalt von 2·5°/₀₀iger Salzsäure, fügt wirksames Pepsin hinzu und beläßt die Mischung einige Zeit bei 37°. Der sich alsbald abscheidende, schwach gelblich gefärbte Niederschlag wird zuerst mit 1°/₀₀iger Salzsäure, dann mit Wasser ausgewaschen, mit Alkohol ausgekocht und mit Äther extrahiert. Man löst darauf in wässerigem Ammoniak, filtriert und fällt das klare Filtrat mit Alkohol. Diesen Niederschlag wäscht man mit Alkohol aus, suspendiert ihn dann in Alkohol und fügt hiezu Salzsäure bis zu stark saurer Reaktion, dann wäscht man den Niederschlag auf dem Filter nochmals mit heißem Alkohol chlorfrei, digeriert ihn mit Äther und trocknet nach dem Filtrieren im Vakuum und zuletzt bei 110°.

Elementarzusammensetzung: C 42·11, H 6·08, N 14·73, S 0·55, P 5·19, Fe 0·29%.

VII. Muzinsubstanzen.

Man faßt in dieser Gruppe solche Proteine zusammen, die sichr wie man glaubte, proteidartig aus einem Eiweißkomplex und eine, Kohlehydratkomponente zusammensetzen. Die neuere Forschung hat nun nachgewiesen, daß diese Zuckerkomponente, die sich erst nach vorangegangener Hydrolyse dieser Proteine durch ihre Reduktionsfähigkeit manifestiert, das Glukosamin ist. Dieses nimmt aber zwischen den Aminosäuren und Kohlehydraten eine Zwischenstellung ein und ist im Protein höchstwahrscheinlich ebenso gebunden, wie die anderen Aminosäuren. Es liegt daher kein Grund vor, in diesen Muzinsubstanzen, etwa in Analogie zu den Nukleoproteiden, einen proteidartigen Aufbau anzunehmen. Insofern ist der bis jetzt übliche Name der Glykoproteide zu verwerfen[2]).

Die äußeren physikalischen Eigenschaften und gerade der Gehalt eines solchen die Reduktion vermittelnden Komplexes aber berechtigen dazu, diese Körper in einer gemeinschaftlichen

[1]) *G. v. Bunge*: Über die Assimilation des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chem. 9. 49 (1885).

[2]) Vgl. hiezu *Emil Abderhalden*: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl. S. 191 ff. *Urban & Schwarzenberg*, Berlin und Wien 1909.

Gruppe zusammenzufassen. Eine Abgrenzung von den übrigen Proteingruppen gelingt leicht. Gewisse Übergänge scheinen nur zu den schleimartigen Nukleoalbuminen zu bestehen, die vor den meisten Muzinsubstanzen durch den Phosphorgehalt ausgezeichnet sind.

Die Eigenschaften dieser „Glykoproteide" oder besser Muzinsubstanzen, welche für ihre Isolierung verwertbar sind, sind die folgenden: Die Muzinsubstanzen bilden lösliche Alkali- bezw. Erdalkalisalze, können also, wenn sie nicht gelöst als solche in Sekreten vorliegen, dem Gewebe mit schwachen Alkalilösungen entzogen werden. Die echten Muzinalkalisalze bilden in Wasser fadenziehende, schleimige Lösungen. Die Muzinsubstanzen sind ferner in verdünnten Säuren unlöslich, daher durch Fällung ihrer Alkalisalzlösung mit Säuren zu reinigen. Da das Verhalten gegen Säuren variiert, unterscheidet man echte Muzine, die mit Essigsäure fällbar und in überschüssiger Essigsäure nicht löslich sind, und Pseudomuzine, die aus salzfreier, wässeriger Lösung durch Essigsäure nicht mehr fällbar sind. Zwischen beiden Gruppen stehen die Mukoide bezw. Muzinoide, denen einige der typischen Muzinreaktionen, z. B. die Unlöslichkeit im Essigsäureüberschuß, fehlen.

Ferner haben die Elementaranalysen und Ergebnisse hydrolytischer Aufspaltung gelehrt, daß man in der großen Gruppe der Muzine bezw. Mukoide Substanzen unterscheiden muß, welche in ihrem Molekül eine Chondroitinschwefelsäure enthalten, und solche, denen diese Komponente fehlt. Die ersteren werden daher als Chondroproteide bezw. „Chondroglykoproteide" bezeichnet.

Inwieweit es sich bei diesen verschiedenen Schleimsubstanzen um spezifische Organeiweißkörper handelt, steht nicht fest. Es ist denkbar, daß zwischen den Muzinen und Mukoiden Übergangsglieder vorkommen, die nur einen anderen physiologischen Zustand der die Muzinsubstanzen produzierenden Zellen darstellen.

Darstellungsmethoden für:

I. Schleimsubstanzen aus schleimhaltigen Sekreten und Flüssigkeiten.

Muzin im Speicheldrüsensekret, Trachealsekret und Sputum. Mukoid im Serum, Aszites, Harn, Ei, Synovia, Glaskörper. Pseudomuzin aus kolloidem oder flüssigem Ovarialzysteninhalt, Paramuzin aus Gallertinhalt von Kystomen oder malignen Geschwülsten der Ovarien.

1. Darstellung von Speichelmuzin nach *Hammarsten*[1]): Man zerschneidet die frische, von Bindegewebe, Blut und Fett befreite Submaxillardrüse möglichst fein und extrahiert diese mit so viel kaltem Wasser, daß ein dünnflüssiges filtrierbares Extrakt entsteht. Die klaren Wasserextraktfiltrate (Filtrieren durch ein sehr dichtes Filterpapier!), die noch durch Zentrifugieren geklärt werden, versetzt man mit so viel Salzsäure, daß die Lösung 0·1 bis 0·15% davon enthält. Die zuerst reichlich auftretende Muzinfällung löst sich fast sogleich beim Umrühren. Unmittelbar darauf fügt man zu der Lösung das vierfache Volumen destillierten Wassers und rührt mit einem Glasstab gut um. Das Muzin windet sich dabei als zäher Klumpen um den Stab. Durch Umrühren dieser am Stab haftenden Masse in 0·1- bis 0·15%iger Salzsäure wird das Muzin sofort wieder gelöst. Man filtriert dann rasch und fällt wieder durch Verdünnen mit Wasser. Dieses Lösen und Fällen wird ein zweitesmal wiederholt. Das Muzin wird nun mit Wasser durchgeknetet und vollständig gewaschen. Hiebei wandelt sich das Muzin in weiße, gequollene Fädchen um, die zuletzt durch Dekantieren mit Wasser gewaschen werden. Alsdann entwässert man mit Alkohol, behandelt mit Äther nach, zerreibt das Muzin zu einem staubfreien Pulver und erschöpft nochmals mit Alkohol und Äther.

Als Vorbehandlung der Drüsen empfiehlt *Levene*[2]) das folgende Verfahren. Die Drüsen werden sofort nach dem Tode des Tieres in Äther aufbewahrt, dann werden sie in einer Fleischhackmaschine zerkleinert. Den Gewebsbrei mazeriert man 24 Stunden lang mit destilliertem Wasser, dem man eine größere Menge Chloroform zugesetzt hat. Nach einem Tage filtriert man durch Gaze und schüttelt dann das Filtrat im Scheidetrichter gut mit Äther durch. Nach 24 Stunden haben sich der Äther, das Fett und die Gewebsteile an der Oberfläche abgeschieden. Der untere Teil der Flüssigkeit wird leicht klar filtriert und nach *Hammarsten* auf Muzin verarbeitet.

2. Darstellung aus Trachealsekret und Sputum nach *Fr. Müller*[3]). Man sammelt das Sputum in Flaschen und versetzt mit 75- bis 80%igem Alkohol. Unter kräftigem Durchschütteln verwandelt sich die Schleimsubstanz in derbe Fäden, die zumeist zu Boden sinken. Das gebildete Sediment bleibt beim Filtrieren durch ein grobmaschiges Koliertuch auf diesem zurück, während die Zellen und feineren Niederschläge das Tuch

[1]) *O. Hammarsten*: Über das Muzin der Submaxillardrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. **12**. 163 (1888).

[2]) *R. A. Levene*: Zur Chemie der Muzine. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 395 (1901).

[3]) *Fr. Müller*: Beiträge zur Kenntnis des Muzins und einiger damit verwandter Eiweißkörper. Zeitschr. f. Biol. **42**. 468 (1901).

passieren. Nun schüttelt man die Muzinfäden mit neuen Mengen 75%igem Alkohol durch und koliert von neuem ab. Diese Alkoholextraktion und das Filtrieren wiederholt man mehrfach, schließlich schüttelt man das Muzin in einem großen Kolben mit 0·5%iger Salzsäure durch. Hiebei lockert es sich ein wenig und quillt etwas auf. Nun koliert man abermals oder filtriert ab. Die nun zum größten Teil von Nukleinen bezw. Nukleoalbuminen befreiten Muzinfäden und Muzinkörner werden mit einer sehr verdünnten Salzlösung durchgeschüttelt, wobei das Muzin zu sagoartigen Körnern anquillt, die wiederum auf einem Koliertuch gesammelt werden. Nun schüttelt man die so gewonnene Muzinmasse abermals mit 0·5%iger Salzsäure, wodurch das Muzin wieder fädig wird, koliert ab und wäscht mit Wasser nach. Die letzten Spuren Salzsäure entfernt man mit Alkohol und löst dann die Masse unter häufigem Umschütteln in ganz verdünnter Natronlauge. Diese fadenziehende Lösung filtriert man durch zahlreiche, häufig zu erneuernde Faltenfilter, zentrifugiert von Zellfragmenten ab und fällt durch schwaches Ansäuern mit verdünnter Essigsäure. Die sich abscheidenden Muzinfäserchen bringt man durch Zusatz von 1 Volumen Alkohol zum Zusammenballen und zum Absetzen. Das weiße Präzipitat wird hierauf gegen fließendes Wasser, dann gegen verdünnte Salzsäure, schließlich gegen destilliertes Wasser dialysiert, mit Alkohol entwässert, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 48·27, H 6·91, N 10·8%.

Das Muzin hat die Eigenschaften echten Muzins.

3. Serummukoid. Siehe Bluteiweißkörper, S. 490, Note 2.

4. Ovomukoid. Siehe Proteine des Eies, S. 495.

5. Aszitesmukoid. Darstellung nach *Hammarsten* (vergleiche auch S. 544, 3): Man befreit die Flüssigkeit unter Aufkochen und vorsichtigem Zusatz von Essigsäure von koagulablem Eiweiß und engt das vollständig neutralisierte Filtrat auf dem Wasserbad ein. Nachdem man durch Filtration von einigen Eiweißflocken getrennt hat, versetzt man die Lösung bis zu beendeter Fällung mit Alkohol. Den abfiltrierten Niederschlag, der meist reichlich Kochsalzkristalle umschließt, preßt man ab und löst ihn abermals in Wasser. In der klar filtrierten Lösung wiederholt man die Alkoholfällung. Den Niederschlag zerreibt man nach dem Abfiltrieren fein mit Alkohol und wäscht ihn gründlich aus. Nach dem Beseitigen des Alkohols löst man ihn in wenig Wasser, dialysiert bis zur Chlorfreiheit der Diffusate und fällt hierauf den Muzinkörper durch Zusatz von Essigsäure aus der leicht opalisierenden Lösung aus. Ein Säureüberschuß ist unschädlich. Nun wäscht man die Fällung mit Wasser, reinigt durch mehrfaches Lösen in sehr ver-

dünntem Alkali und Fällen mit Essigsäure und behandelt nach abermaligem Waschen auf dem Filter mit Alkohol und Äther.

In ganz der gleichen Weise lassen sich auch Mukoide aus serösen Exsudaten und Hydrokelenflüssigkeit isolieren.

Über die Beziehung dieser Körper zu Nukleoalbuminen siehe S. 531.

6. Synoviamukoid. Darstellung nach *v. Holst*[1]). Man verdünnt die klare, blutfreie Synoviaflüssigkeit mit dem dreifachen Volumen Wasser und säuert die Lösung mit so viel Essigsäure an, daß der Gesamtgehalt der Säure 1% Essigsäure beträgt. Die grobfaserige Fällung wickelt man durch Umrühren um einen Glasstab, den festhaftenden Klumpen löst man in Wasser unter Zusatz von wenig Alkali, filtriert die Lösung und fällt wiederum mit Essigsäure. Der in dieser Weise mit Essigsäure dreimal gefällte Körper wird mit Alkohol und Äther vollständig erschöpft und bei 110° getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 51·95, H 6·53, N 13·01, S 1·34%.

Die sub 6 genannte Methode kann auch zur Darstellung des Aszitesmukoides (vgl. 5) verwendet werden.

7. Harnmukoid (nach *Mörner*[2]) stellt eine durch Essigsäure gefällte Muzinsubstanz aus der sogenannten Nubekula des normalen Harnes dar. In den durch Chloroform konservierten normalen Harnen läßt man die Nubekula absitzen. Der klare Harn wird dann abgehebert und das Sediment auf Filtern gesammelt. Den schleimigen Belag des Filters überträgt man alsbald in verdünnten 95%igen Alkohol. Man fährt mit dem Sammeln dieser Niederschläge fort, bis etwa 250 *l* Harn verarbeitet sind. Das gesammelte Sediment der Alkoholkonservierung verteilt man in Wasser und versetzt die Emulsion mit Ammoniak bis zu eben schwach alkalischer Reaktion. Nachdem der größere Teil der Muzinsubstanz gelöst ist, leitet man in die nicht filtrierte Lösung (Gesamtmenge etwa 1500 cm^3) CO_2 bis zu schwach saurer Reaktion und läßt dann ein bis zwei Tage in der Kälte stehen. Von der Trübung filtriert man dann durch gutes Filtrierpapier klar ab. Das Filtrat wird hierauf auf einen Gehalt von 0·4% Essigsäure gebracht. Dabei wird die Lösung dickflüssig, bleibt aber im allgemeinen klar. Durch Schütteln derselben mit einer großen Menge Chloroform entsteht alsbald eine flockige Abscheidung, die man durch Zentrifugieren sammelt. Das Chloroform wird vorher abgetrennt. Den erhaltenen

[1]) *G. v. Holst*: Serosamuzin, eine Muzinsubstanz in Aszitesflüssigkeit und Synovia. Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 145 (1904).

[2]) *K. A. H. Mörner*: Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharnes. Skand. Arch. f. Phys. **6**. 332 (1895).

Niederschlag wäscht man auf dem Filter mit Chloroform gesättigter 0·2- bis 0·4%iger Essigsäure aus. (Bisweilen gehen hiebei nicht unbeträchtliche Muzinmengen eines vielleicht besonderen Muzins in Lösung.) Der säureunlösliche Filterrückstand wird in ganz wenig verdünntem Ammoniak gelöst und mit Essigsäure umgefällt und diese Fällung so oft wiederholt, bis sich das Mukoid als harnsäurefrei erweist. Zuletzt behandelt man die Fällung mit Alkohol und dann mit Äther, zerreibt sie gut mit Äther und trocknet dann im Vakuum über Schwefelsäure.

Das in Essigsäure lösliche Mukoid (vgl. oben die Klammerbemerkung) wird nach dem Einengen seiner neutralisierten Lösung mit säurehaltigem Alkohol gefällt. Der entstehende Niederschlag, dessen Menge sehr wechselnd ist, wird in wenig Wasser gelöst, durch Dialyse von Salzen befreit und in der salzarmen Lösung vereint mit Alkohol versetzt. Hiebei bleibt die Lösung zunächst klar. Durch Zusatz einer geringen Menge wässeriger Kochsalzlösung erzeugt man eine flockige Fällung, welche auf dem Filter mit Alkohol und mit Äther behandelt und im Vakuum getrocknet wird.

Die mittlere Zusammensetzung des Körpers beträgt: C 49·40, N 12·74, S 2·30%. Phosphor ist nur in minimalen Spuren oder gar nicht vorhanden. $(\alpha)_D = -62$ bis $67 \cdot 1^0$. Der Körper zeigt nach erfolgter Säurespaltung eine reduzierende Kohlehydrat- oder kohlehydratähnliche Komponente. Er enthält keine Chondroitenschwefelsäure.

Sahlstedt[1]) hat aus Pferdeharn durch langdauernde Dialyse nach Ansäuern mit Essigsäure ein Harnmukoid dargestellt, das nach Lösen in Alkali und Fällen mit Säure gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet wurde. Die Elementaranalyse ergab:

C 49·5, H 6·4, N 12·1, S 1·9, O 30·1.

8. Hyalomukoid aus dem Glaskörper des Auges (nach *Mörner*[2]).

Man zerschneidet den Glaskörper mit der Schere, treibt die Masse durch ein Sieb und filtriert durch ein Papierfilter die wasserklare, nicht fadenziehende Flüssigkeit, die mit Essigsäure zunächst keine Fällung gibt. Man verdünnt die Lösung mit 2 bis 3 Volumen Wasser und erhält jetzt durch Essigsäurezusatz eine

---

[1]) *A. V. Sahlstedt*: Die Schleimsubstanz des Pferdeharnes. Skand. Arch. f. Physiol. **34**. 183 (1916).

[2]) *C. Th. Mörner*: Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. III. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 244 (1894).

Fällung, wenn die Mischung etwa 1% Säure enthält. Nach zwei Tagen dekantiert man die über der Fällung stehende, noch trübe Flüssigkeit ab. Der grauweiße festklebende Bodensatz wird in schwachem Alkali gelöst und durch zwei- bis dreimaliges Ausfällen aus solcher Lösung mit Essigsäure gereinigt.

Elementarzusammensetzung: N 12·27, S 1·19%.

II. Schleimsubstanzen im Sekret als Hüllensubstanz.

1. Eihüllenmukoid. Darstellung nach *v. Fürth*[1]).

Die Eihülle der Amphibieneier (z. B. Frosch) oder niederer Tiere (z. B. Sepien) bestehen aus „Glukoproteiden". Durch leichten Druck kann man die Eihüllen von den frischen Eiern abtrennen, nachdem man die Spitze der Eihülle angeschnitten hat. Die schleimige Masse, die natürlich frei von Farbstoffen und Pigmenten sein muß, wird mit Alkohol versetzt, getrocknet und dann mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther erschöpft.

Ein Muzin der Sepien zeigte die Zusammensetzung: C 49·70, H 6·96, N 10·75%, erinnert also an das Pseudomuzin (siehe unten), ein Muzin der Froscheihüllen ergab: C 52·7, H 7·1, N 9·3% (*Giacosa*).

2. Muzin der Schnecke (Mantelmuzin, Fußmuzin[2]).

Mantelmuzin von Helix pomatia (Weinbergschnecke). Man gewinnt das Muzin durch mechanische Reizung der physiologischen Sekretion der Eiweißdrüse. Zu diesem Zweck legt man das äußerlich mechanisch gereinigte Tier in Wasser von 20 bis 30°. Wenn nach geraumer Zeit das Tier den Fuß in ganzer Länge ausgestreckt hat, so umfaßt man den Fuß mit einem Tuch so fest, daß sich das Tier nicht wieder in das Gehäuse zurückziehen kann. Der Teil der Manteloberfläche, an dem der Ausführungsgang der „Eiweißdrüse" sitzt, liegt dann frei. Man reizt denselben mit einem abgerundeten Glasstab und läßt dann das sich abscheidende, rahmähnliche Sekret sich direkt mit Wasser mischen. Man erhält so eine weißliche, stark sch'eimige, gequollene Masse. Diese wird mit Wasser zu einer gleichförmigen Emulsion zerrieben, sofort mit überschüssiger Essigsäure versetzt und tüchtig durchgerührt. Das sich in feinen Klümpchen abscheidende Muzin wird auf dem Filter

[1]) *O. v. Fürth*: Über Glykoproteine niederer Tiere. *Hofmeisters* Beitr. **1**. 252 (1901).

[2]) *O. Hammarsten*: Studien über Muzin und muzinähnliche Substanzen. *Pflügers* Arch. **36**. 373 (1885).

gesammelt, sobald diese im Kontakt der Essigsäure hart und fest geworden sind. Dann zerreibt man sie fein und wäscht durch Dekantieren mit essigsäurehaltigem Wasser, bis sich die Waschwässer, mit oxalsaurem Ammon geprüft, als kalkfrei erweisen. Hierauf entfernt man durch Waschen mit Wasser die Essigsäure und extrahiert den Rückstand mit warmem Alkohol und Äther. (Durch Zusatz von Essigsäure klärt sich die Lösung insofern, als unter CO_2-Entwicklung die anorganischen Anteile in Lösung gehen und sich die muzinähnliche Substanz zu Fasern oder Klümpchen zusammenballt.)

Zur Gewinnung eines unveränderten Muzins ist es zweckmäßig, das frisch sezernierte Mantelmuzinogen nicht zu lange im Kontakt mit Wasser zu lassen. Man verarbeitet zweckmäßig auf einmal je 100 Schnecken und dann sofort das aus ihnen gewonnene Sekret in der beschriebenen Weise.

Diese hier beschriebene Methode zur Darstellung eines Sekretmuzins niederer Tiere dürfte auch für andere, bisher nicht untersuchte Muzine von Weichtieren im Prinzip geeignet sein. In allen Fällen aber muß man sich davon überzeugen, wie die Löslichkeitsverhältnisse des Muzins sind, ehe man an die Darstellung größerer Mengen geht. Auch ist es wichtig, sich im Verlauf der vorzunehmenden Operationen zu überzeugen, daß die Muzinfällungen ihre genuine Löslichkeit bewahrt haben, also keine sekundären Veränderungen erleiden.

Fußmuzin. In Fällen, in denen sich das muzinhaltige Sekret nicht direkt aus dem Drüsenausführungsgang einer isolierten Drüse isolieren läßt, verwendet man das muzindrüsentragende Gewebsstück als ganzes, indem man dasselbe durch einen Scherenschlag von dem Tiere trennt und mit ganz verdünnter Lauge (0·01 bis 0·02% KOH) in der Kälte extrahiert. (In dieser Weise verfuhr *Hammarsten* zur Isolierung des Schneckenfußmuzins.) Auch hier ist es nötig, sich vor Verunreinigungen mit Gewebeproteinen, die aus der Wundfläche abtropfen können, zu schützen. Man muß diese vor der weiteren Verarbeitung gut mit einem Tuch trocknen. Schließlich ist auf die absolute Freiheit der Muzinlösungen von morphologischen Elementen zu achten. Man muß, um klar filtrierende Lösungen zu erhalten, oft enorm verdünnen; so verdünnte *Hammarsten* das Alkalieytrakt von 60 bis 70 Schnecken mit 9 bis 12 *l* Wasser. Im übrigen ist die Isolierung eines Muzins die für das Mantelmuzin angegebene Methode von *Hammarsten*. Ist man sicher, das Muzin relativ alkaliresistent ist, so versucht man die Reinigung durch Lösen in starkem Alkali und Fällen mit Essigsäure.

III. Muzinsubstanzen in pathologischen Sekreten.

1. Pseudomuzin. Für die Darstellung dieses Körpers kommt die von *Hammarsten*[1]) ausgearbeitete Methode in Betracht.

Man fällt eine größere Menge der nach Möglichkeit dünnen und klar filtrierten Zystenflüssigkeit mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Alkohol. Unter Umrühren mit dem Glasstab windet sich der entstandene Niederschlag um den Glasstab. In dieser Weise wird der Körper sofort aus der sonst noch durch feine Flocken getrübten Lösung herausgenommen, abgepreßt und unter Alkohol fein verteilt. Der Alkohol wird alsdann durch Äther verdrängt und die stark gepreßte Masse nach Verdunsten des Äthers zu einem staubfeinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird in Wasser zu einer schleimigen Lösung gebracht und wie oben erneut mit Alkohol gefällt und mit Äther gereinigt.

Der Körper verliert nach längerem Liegen seine Löslichkeit in kaltem und warmem Wasser, so daß ältere Präparate zu Vergleichszwecken mit einem etwa fraglichen Pseudomuzin nicht verwertbar sind.

Elementarzusammensetzung: C 49·44 bis 50·05, H 6·84 bis 7·11, N 10·26 bis 10·30, S 1·25%.

2. Das Paramuzin findet sich nicht in dem zähschleimigen Zysteninhalt, sondern in der festen, zitternden kolloid- und gallertähnlichen Kystomflüssigkeit der Ovarialkystome (*Mitjukoff*[2]).

Darstellung. Da dieses Rohsekret nicht filtrierbar ist, so bringt man die gesamte Masse (nach Entfernen etwa bluthaltiger Partien) durch Zusatz von einer beträchtlichen Menge von salzsäurehaltigem Wasser zum Schrumpfen. Das Wasser soll so viel Salzsäure enthalten, daß Kongopapier eben blau gefärbt wird. Die sich nunmehr faserig oder bröckelig abscheidende Masse wird nun mit ebenso schwach salzsäurehaltigem Alkohol gewaschen, bis die Waschalkohole ungefärbt (hämatinfrei!) abfließen. Zu diesem Zweck muß die Substanz mit Alkohol innig verrieben werden. Hierauf behandelt man mit absolutem Alkohol, verdrängt den Alkohol mit Äther und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure zu einem nun leicht pulverisierbaren Körper.

Zusammensetzung: C 51, H 7·76, N 10·70, S 1·09%.

---

[1]) *O. Hammarsten*: Metalbumin und Paralbumin. Ein Beitrag zur Chemie der Kystomflüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. **6**. 194 (1882).

[2]) *K. Mitjukoff*: Über Paramuzin. Inaug.-Diss. Bern 1895; Arch. f. Gyn. **49**. 278 (1895).



3. Aus Aszitesflüssigkeit vom Menschen hat *A. Oswald*[1]) wie folgt ein Mukoid dargestellt.

Aus 6 *l* Flüssigkeit wurde die in gesättigter Ammonsulfatlösung entstehende Albuminfraktion gewonnen, abfiltriert und in destilliertem Wasser gelöst. Die ausdialysierte Lösung wurde sodann durch Hitzekoagulation unter Zusatz von verdünnter Essigsäure vom Albumin befreit und das gelbliche Filtrat auf dem Wasserbad stark eingeengt. Ausgeschiedene Flocken wurden abfiltriert und sodann wurde aus dem Filtrat mit 96%igem Alkohol das Mukoid als weißer Niederschlag ausgefällt. Die Substanz bildete nach dem Trocknen, im Vakuum über $H_2 SO_4$ zerrieben, ein schwach gelbliches Pulver (vgl. S. 538, 5).

Ferner hat *Oswald*[2]) ein „Myxomuzin" aus den Extrakten eines Myxoms durch Ausfällen mit Essigsäure und Umfällung aus Na OH dargestellt. Die Elementarzusammensetzung dieser Substanz war: C 50·82, H 7·27, N 12·24, S 1·19, P 0·25, O 28·23.

Unterscheidungsmerkmale von Pseudomuzin und Paramuzin.

Das Paramuzin ist durch Essigsäure und Mineralsäuren aus seinen Lösungen, d. h. den wässerigen Lösungen seiner Alkalisalze fällbar. Das Pseudomuzin wird durch Essigsäure nicht gefällt. Das Paramuzin ist im Überschuß von Essigsäure wieder löslich. Es muß aber bemerkt werden, daß die Artverschiedenheit beider Körper keine absolut gesicherte ist. Die Alkaliempfindlichkeit des Paramuzins ist eine so große, daß möglicherweise schon die Lösung desselben in der zur Lösung nötigen Alkalimenge eine Spaltung herbeiführt und damit die Bedingung für das vom Pseudomuzin verschiedene Verhalten gegen Essigsäure erfüllt wird.

IV. Schleimsubstanzen als normale Bestandteile zellreicher Gewebe und Organe.

In einer ganzen Reihe von Organen, die selbst keine Schleim sezernierende Drüsen besitzen, sind echte Muzine und Mukoide vorhanden.

Man kennt ein Muzin des Nabelstranges, der Sehnen, ein Mukoid der Kornea und Mukoide der Knorpel, Knochen, Sehnen. Die letzteren zählen durch ihren Gehalt an Chondroitinschwefelsäure zur Spezialgruppe der sogenannten Chondroproteide. Auch die gallertige Grundsubstanz mancher

---

[1]) *Adolf Oswald*: Gewinnung von salzsaurem Glukosamin aus Mukoid aus Aszitesflüssigkeit. Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**. 100 (1915).

[2]) *Adolf Oswald*: Über Myxmuzin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**. 144 (1914).

niederer Tiere, wie die des Gallertschwammes, zählt zu diesen Substanzen.

Prinzipien der Darstellung. Die Isolierung dieser Muzinsubstanzen erfordert eine Extraktion der muzinhaltigen Gewebe. Die Aufgabe der verwertbaren Methode beruht nun darin, das geeignete Extraktionsmittel zu verwenden, das möglichst wenig andere nicht muzinartige Proteine oder Proteide in Lösung bringt, zugleich aber keine sekundäre Veränderung der in Lösung gehenden Schleimsubstanzen verursacht. Die bisher üblichen Methoden erfüllen nun diese beiden Postulate nicht vollständig, und wenn man die Analysenergebnisse der nach verschiedenen Methoden dargestellten Körper, besonders den variablen Gehalt an Schwefel berücksichtigt, so drängt sich der Gedanke auf, daß die Methoden der Extraktion die Natur und Zusammensetzung der isolierten Substanzen nicht unwesentlich beeinflussen.

Als Extraktionsmittel sind zu verwenden allein oder in sich abwechselnder Kombination: Wasser oder stark verdünnte Alkalilösungen (NaOH oder $Ca[OH]_2$). Bei manchen Organen muß der Extraktion eine vorbereitende Entkalkung mit Säuren vorangehen.

1. Wasserextraktion, verwendbar für Nabelstrangmuzin (*Jernström*[1]):

Aus möglichst frischen Nabelsträngen präpariert man die Gefäße heraus, zerkleinert hierauf das sulzige Gewebe fein und behandelt längere Zeit mit häufig erneuertem, kaltem Wasser. Die gewonnenen Lösungen werden filtriert. Durch Essigsäure wird ein fadenziehender Körper gefällt. Ein Überschuß von Essigsäure schadet nicht, daß sich der Körper wie ein echtes Muzin im Säureüberschuß nicht löst. Dieser Körper wird in der wiederholt beschriebenen Weise durch Aufwickeln um einen Glasstab aus der Flüssigkeit genommen und durch Lösen in Wasser und Umfällen mit Essigsäure usw. gereinigt. Auch die für das Submaxillarmuzin angegebene Methode ist verwertbar (vgl. S. 537, Note 1).

2. Alkaliextraktion, verwendbar für Korneamukoid[2]).

Von der herausgeschnittenen Hornhaut des Rinderauges entfernt man mit einem Hornmesser das Epithel und die *Descemet*sche Membran und zerkleinert die Kornea in der Fleischhackmaschine

[1]) *E. A. Jernström*: Einige Beiträge zur Kenntnis des Muzins. Upsal. läkaref. För handl. **15**. 434 (1680); *Malys* Jahresber. 1880, S. 34.

[2]) *C. Th. Mörner*: Untersuchungen über die Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 213 (1894).

(man verarbeitet am besten 100 bis 300 Stück). Hierauf schlemmt man den Gewebebrei in einer 0·02%igen Kalilauge oder in 0·02%igem Ammoniak auf. Auf jede Kornea sind 10 cm^3 der Extraktionslösung zu verwenden. Nach zwei- bis dreitägiger Extraktion bei Zimmertemperatur trennt man durch Filtration und gewinnt ein klares, dünnflüssiges, nicht fadenziehendes Filtrat. Nun setzt man etwas verdünnte Essigsäure oder verdünnte Salzsäure zu. Der zuerst feinflockige, später gröbere Niederschlag setzt sich nach einem Tag als zusammenhängende Masse ab. Den Bodensatz löst man nach Abgießen der Flüssigkeit mit wenig Alkali zu einer neutral reagierenden Lösung, fällt vereint mit Säure und reinigt durch mehrfache Umfällung und Behandeln mit Alkohol und Äther.

Zusammensetzung: C 50·16, H 6·97, N 12·79, S 2·07%.

Für Chondromukoid nach *C. Th. Mörner*[1]).

I. Man digeriert den zerkleinerten Trachealknorpel mit thymolhaltigem Wasser (0·5 *l* auf 100 *g* Knorpel) bei 40°. Nach mehreren Tagen trennt man das Wasserextrakt durch Filtration von den Knorpelteilen. Das dickflüssige, aber nicht fadenziehende Filtrat wird bis zu 0·2% mit Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbad erwärmt. Erst bei dem Erwärmen beginnt sich die Flüssigkeit zu trüben und läßt alsbald einen flockigen Niederschlag absitzen. (Der Salzsäurezusatz allein erzeugt wegen der fällungshemmenden Wirkung der Chondroitinschwefelsäure noch keine Niederschlagsbildung!) Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und mehrfach aus seiner Lösung in schwachem Alkali mit Salzsäure grobflockig gefällt. Nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther trocknet man im Vakuum.

II. Darstellung des Mukoides neben Glutin. Man digeriert die fein zu Spänen zerschabten Trachealknorpel kurz mit destilliertem Wasser. Dann digeriert man längere Zeit bei 40° mit 0·1- bis 0·2%iger Salzsäure und filtriert von den glutinhaltigen Digestionsflüssigkeiten ab.

Die zurückbleibenden Knorpelspäne werden kurz mit Wasser von 40° gewaschen und hierauf in 0·05- bis 0·1%iger Kalilauge eingetragen. Hiebei wird das Mukoid herausgelöst. Von dem ungelösten, in Form eines zierlichen Balkennetzes zurückbleibenden Albumid trennt man durch Filtration. Die Filtrate werden mit Säure gefällt, das ausgeschiedene Mukoid wird wie oben weiter gereinigt.

---

[1]) *C. Th. Mörner*: Chemische Studien über Trachealknorpel. Skand. Arch. f. Phys. **1**. 210 (1889).

Elementarzusammensetzung im Mittel: C 47·30, M 6·42, N 12·58, S 2·42%. Das Mukoid enthält Chondroitinschwefelsäure als organisch gebundenen Molekülanteil.

3. Extraktion mit Kalkwasser.

Für Sehnenmuzin (Tendomukoid) nach *Cutter* und *Gies*[1]).

Als Ausgangsmaterial dient die Achillessehne des Rindes. Das Gewebe wird sofort post mortem sauber präpariert und fein zerschnitten. Die Stücke werden hierauf mit Wasser gewaschen und der Extraktion mit halbgesättigtem Kalkwasser (2 cm^3 auf 1 *g* Sehne) überlassen. Von Zeit zu Zeit ist die Extraktionslösung gut durchzuschütteln. Das klar filtrierte Extrakt wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert, so daß die Lösung 0·2% H Cl enthält. Der Niederschlag wird auf Seiden- oder Papierfiltern zuerst mit verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser eiweiß- bezw. salzsäurefrei gewaschen. (Die Waschflüssigkeiten dürfen keine Biuretreaktion geben und müssen chlorfrei sein.) Nun wiederholt man Lösung in verdünnter Lauge, Fällen mit verdünnter Salzsäure und ausgiebiges Waschen und reinigt dann, zur Entfernung von Extraktivstoffen und von Fett, mit großen Mengen heißen Alkohols und Äthers. Man trocknet im Vakuum.

Elementarzusammensetzung: C 47·47, H 6·68, N 12·58, S 2·41%.

Die Einheitlichkeit des so dargestellten Körpers ist fraglich. Die Sehnen enthalten anscheinend mehrere Mukoide.

Für Knochenmukoid (Osseomukoid) nach *Hawk* und *Gies*[2]).

Die Femurknochen frisch geschlachteter Tiere werden sofort aus dem Gewebe und Periost herauspräpariert, durch Ausspülen mit fließendem Wasser während 24 Stunden vom Knochenmark befreit und nach dieser Zeit nochmals sorgfältig durch Abschaben von Bindegewebsresten gereinigt. Nunmehr entkalkt man, indem man die Knochen mehrere Stunden in einer einigemal erneuerten Lösung von 0·2- bis 0·5%iger Salzsäure liegen läßt. Danach schabt man die oberflächlich entkalkten Schichten mit einem scharfen

[1]) *W. D. Cutler* und *W. J. Gies*: Das Muzin des weißen, fibrösen Bindegewebes. Journ. exp. Med. **1.** 186 (1896); Die Zusammensetzung des Sehnenmukoides. Amer. Journ. of Phys. **6.** 155 (1901).

[2]) *P. B. Hawk* und *W. J. Gies*: Chemische Studien über Osseomukoid mit Bestimmung der Verbrennungswärme usw. Amer. Journ. of Phys. **5.** 387 (1901).

Skalpell ab. Dann wiederholt man die Entkalkung für einige Stunden und schabt wiederum die Knochensubstanz ab. Also fährt man fort, bis nur noch eine kleine dünne Knochenlade vorhanden ist. Das durch Abschaben gewonnene Produkt, das man in einer 0·2%igen Salzsäure gesammelt hat, wird dann vereinigt (1700 *g* aus 24 Femurknochen in 14 Tagen gewonnen), mit fließendem Wasser chlorfrei gewaschen und dann unter häufigem Schütteln mit halbgesättigtem Kalkwasser extrahiert (2 bis 5 cm^3 Lösung auf 1 *g* Knochensubstanz). Die Extraktion setzt man 48 Stunden lang fort. Nach dieser Zeit filtriert man und fällt das Filtrat mit 0·2%iger Salzsäure.

Die weitere Reinigung erfolgt in der für Sehnenmukoid beschriebenen Weise.

V. Schleimsubstanzen als Gewebseinlagerung (Amyloid).

1. Mechanisch isoliertes Amyloid (*O. Hanssen*[1]). Man zerschneidet die amyloid degenerierten Milzen in Lamellen und drückt aus diesen die Sagokörner mit der Pinzette oder dem Skalpell heraus. Den gesammelten Brei schüttelt man längere Zeit auf der Schüttelmaschine mit destilliertem Wasser. Dann verdünnt man die Lösung mit Wasser, so daß sich die Amyloidkörner aus der Suspension zu Boden senken. Durch Dekantieren trennt man den Bodensatz von der Gewebsfetzensuspension, dann reinigt man durch häufiges Aufrühren und Dekantieren mit Wasser. Die letzten Gewebsfetzen werden mit der Pinzette entfernt. Es hinterbleibt das Amyloid zuletzt in Form homogener, runder oder elliptischer Körner. Man wäscht dieselben mit destilliertem Wasser, trocknet bei 40°, pulverisiert und trocknet abermals im Vakuum über Schwefelsäure.

Das so dargestellte intakte Amyloid enthält keine Chondroitinschwefelsäure. Das intakte Amyloid ist also mit der nach *Krawkow* isolierbaren Substanz nicht identisch. Diese ist ein durch die Verdauung verändertes, durch andere Körper gewiß auch verunreinigtes Amyloid.

2. Amyloid nach *Krawkow*[2]). Die amyloid entartete Leber oder Milz (oder normales Aortengewebe) wird von der Kapsel und von Gefäßen befreit und dann gut zerkleinert. Den Gewebebrei rührt man zuerst mit kaltem Wasser und hierauf mit schwachem

[1]) *O. Hanssen*: Ein Beitrag zur Chemie der amyloiden Entartung. Biochem. Zeitschr. **13**. 185 (1908).

[2]) *A. P. Krawkow*: Beiträge zur Chemie der Amyloidenentartung Arch. f. exp. Pharm. **40**. 195 (1898).



Ammoniak an. Nach einigen Stunden gießt man die NH_3-haltige Lösung ab und zerreibt den Rückstand durch ein dichtes Nickeldrahtnetz. Die zerriebene Masse wird mit verdünntem Ammoniak angerührt und mit dieser oft erneuerten Lösung durch Dekantieren so lange gewaschen, bis die Waschflüssigkeiten klar und farblos geworden sind. Die letzten Filtrate müssen auch frei von Chondroitinschwefelsäure sein. (Man prüft auf diese Säure, indem man diese Probe mit verdünnter Salzsäure kocht und danach auf die Anwesenheit einer durch Hydrolyse abgespaltenen Schwefelsäure mit Bariumchlorid prüft.)

Nach der Ammoniakbehandlung wäscht man den Gewebsrückstand mit Wasser und unterwirft ihn einer viertägigen Verdauung mit wirksamem Magensaft (Infus einer Magenschleimhaut mit 0·4%iger Salzsäure). Der unverdaute Rückstand, der aus Amyloid und Nukleinen besteht, wird zuerst mit schwacher Salzsäure, dann mit Wasser auf dem Filter ausgewaschen. Hierauf versetzt man die Masse mit sehr verdünnter Ammoniaklösung, in welcher sich das durch Verdauung wohl irgendwie veränderte „Amyloid" nunmehr zum größten Teil auflöst. Aus der filtrierten ammoniakalischen Lösung fällt man mit verdünnter Salzsäure einen reichlichen, flockigen — bisweilen auch gallertigen — Niederschlag, den man einer zweiten Pepsinsalzsäureverdauung unterwirft. Den unverdauten Rückstand bringt man auf ein Filter, wäscht mit Wasser aus, löst ihn in Ammoniak und fällt wiederum mit Salzsäure. Den Niederschlag sammelt man auf einem Filter, wäscht ihn mit Wasser frei von Ammonsalzen und behandelt ihn mit einer verdünnten Barythydratlösung. Hiedurch geht das Amyloid in Lösung und wird durch Filtration von ungelösten Nukleinresten getrennt. Aus der Barytlösung fällt man wiederum mit Säure und behandelt den abfiltrierten Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther.

Das so dargestellte Amyloid ist kein intaktes Gewebsamyloid. Im Gegensatz zu dem nach *Hanssen* dargestellten Körper enthält er Chondroitinschwefelsäure, ist also, soweit sich beurteilen läßt, nicht rein.

Die Elementarzusammensetzung ist im Mittel: C 46·92, H 6·60, N 14·16, P 1·16%.

Analytisch sind sehr inkonstante Werte gefunden worden. Es ist wahrscheinlich, daß auch der hohe Phosphorgehalt die Folge einer Beimengung eines Nukleoproteides ist.

Nachweis von Amyloid in Organen. Man versetzt das Rohorgan oder einen dünnen Schnitt desselben *a*) mit Jod: es entsteht eine rötlichbraune bis violette Färbung, *b*) mit Jod

und Schwefelsäure: es entsteht eine violette bis blaue Färbung, *c*) mit Methylviolett: es bildet sich eine rote oder rötliche Farbe. Die Jodreaktionen fallen nicht bei allen Amyloidorganen positiv aus.

Anmerkung: Ein großer Teil der hier beschriebenen Proteine ind auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht worden. Vgl. hierüber die Zusammenstellung bei *Emil Abderhalden*: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl., S. 233 ff. *Urban & Schwarzenberg*, Berlin und Wien 1909; Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der speziellen Eiweißchemie. S. 74 ff. *Gustav Fischer*, Jena 1909.

Proteinoide[1]).

Von **Eduard Strauss**, Frankfurt a. M.

Die Zusammenstellung der sogenannten Proteinoide in einer besonderen Gruppe läßt sich heute nur noch durch den Hinweis rechtfertigen, daß sie sich zumeist als Gerüstsubstanzen der tierischen Organismen charakterisieren lassen sowie daß sie sich alle durch eine besonders hohe Resistenz gegenüber denjenigen Agentien auszeichnen, welche die nativen Eiweißkörper leicht lösen und verändern. Aus diesem letzteren Gesichtspunkt ergibt sich schon ganz allgemein für ihre Darstellung bezw. Isolierung, daß man die Ausgangsmaterialien aufeinander folgend mit verschiedenen eiweißlösenden Agentien (Säure, Alkali, Verdauungsfermente) zu behandeln hat, um zu den eigentlichen Proteinoiden zu gelangen. Daß die hiebei erhaltenen Substanzen nicht unbedingt einheitlich sein können, ist sicher. Da wir eine chemische Einteilung dieser Gruppe veränderter Eiweißkörper nicht zu geben vermögen, weil sie ja nach den Untersuchungen *Fischers*[2]), *Abderhaldens*[3]) und ihrer Mitarbeiter sicherlich in chemischer Beziehung die größten Verschiedenheiten aufweisen, befolgen wir in dieser Darstellung eine Einteilung nach rein zoologischen Gesichtspunkten. Wir schildern demnach zuerst die Darstellung der Proteinoide der Wirbellosen, sodann die der Proteinoide der Wirbeltiere.

A. Proteinoide der Evertebraten.

I. Das Spongin.

Spongin ist die von den protoplasmatischen Elementen befreite Gerüstsubstanz der Spongien, und zwar speziell die des Badeschwammes, der Euspongia.

Zur Reindarstellung des Materials verfährt man folgendermaßen (*Strauss*[4]): Die Schwämme werden in sehr kleine Stücke

[1]) Der Name Proteinoide tritt an die Stelle von „Albuminoide". Vgl. *Emil Abderhalden*: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 4. Aufl. S. 432 ff.

[2]) Vgl. *E. Fischer*: Untersuchungen über Aminosäuren usw. Berlin 1906.

[3]) Vgl. *E. Abderhalden*: Lehrbuch der physiol. Chem. 3. Aufl. Berlin 1914. Bd. I. 394.

[4]) *E. Strauss*: Studien über die Albuminoide usw. *Winter*, Heidelberg 1904.

geschnitten, durch Klopfen von Staub und Konkrementen möglichst vollständig befreit und sodann mit Wasser gut gespült. Die Schwammstücke werden nun drei vis vier Tage lang in der Kälte mit einer 10 bis 15%igen, jeden Tag gewechselten Salzsäure digeriert. Nach gutem Abpressen der Säure werden die Stücke zuerst mit heißem, dann mit kaltem Wasser abgespült, bis die Salzsäure verschwunden ist, sodann mit Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen und getrocknet. Zur Reinigung der Kakospongien ist die fünftägige Verwendung einer 20%igen Salzsäure nötig. Die verbleibende feste, schwarze, faserige Masse wird mit Wasser völlig ausgewaschen und dann noch zwei Tage lang mit kalter 5%iger Kalilauge digeriert. Verfährt man sodann wie oben geschildert weiter (Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther), so erhält man schließlich das Spongin in erwünschter Reinheit.

Über die Resultate der Totalhydrolyse des Spongins vgl. [1]), [2]), [3]) und [4]).

II. Das Kornein und das Gorgonin.

Kornein nennt man nach *Valenciennes*[5]) die organische Grundsubstanz der Korallen. *Krukenberg*[6]) hat das Kornein dargestellt, indem er Achsenskelette von Ripidogorgia flabellum, Gorg. verrucosa, Antipathes mit verdünnter Salzsäure entkalkte, dann mit Alkohol, Äther, Pepsin, Trypsin, 10 bis 20%iger Natronlauge digerierte und schließlich mit Wasser abspülte. Einfacher ist die Methode zur Darstellung des von *Drechsel*[7]), von *Henze*[8]) und von

---

[1]) *E. Abderhalden* und *E. Strauss*: Die Spaltprodukte des Spongins mit Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 49 (1906).

[2]) *A. Kossel* und *F. Kutscher*: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 214 und 205 (1901).

[3]) *R. Engeland*: Über den Nachweis von Monoaminosäuren. Zeitschr. f. Biol. **63**. 470 (1914).

[4]) *Henry L. Wheeler* und *Lafayette B. Mendel*: Der Jodkomplex in Schwämmen. Journ. of biol. Chem. **7**. 1 (1909). Ferner: *A. Oswald*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. **75**. 353 (1911).

[5]) *Valenciennes*: Extrait d'une monographie de la famille des Gorgonides de la Classe des Polypes. Compt. rend. de l'Acad. des sciences de Paris. **41**. 11 (1855).

[6]) *Krukenberg*: Kornein. Vgl. Studien. I. Reihe. 5. Abt. 2 bis 16 (1881); Über das Kornein. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **17**. 1843 bis 1846 (1884); Vorträge. 209 bis 211 (1886); Fortgesetzte Untersuchungen über Skeletine. Zeitschr. f. Biol. **22**. 251 bis 254 (1886).

[7]) *E. Drechsel*: Beiträge zur Chemie einiger Seetiere. I. Über das Achsenskelett von Gorgonia Cavollini. Über das Jod im Gorgonin. Die Leibessubstanz der Gorgonia. Zeitschr. f. Biol. **33**. 90 bis 107 (1896).

[8]) *M. Henze*: Zur Chemie des Gorgonins und der Jodgorgosäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 60 (1903); **51**. 64 (1907).

A. Oswald[1]) untersuchten Gorgonins, der proteinoiden Grundsubstanz von Gorgonia Cavollini. Die Gorgonia Cavollini ist eine Weichkoralle, deren rote Polypenmasse sich leicht mechanisch von dem hornartigen Achsenskelett abtrennen läßt, welches sodann in lufttrockener Form zu den Untersuchungen dient.

Zur Reinigung des Gorgonins verfährt man folgendermaßen: Die Gorgoninstücke werden zuerst einem Prozesse zur Entfernung der verschiedenen anhaftenden Substanzen, speziell der unorganischen Stoffe unterworfen. Nach vorläufigem Aufweichen in 1%iger Essigsäure und sorgfältiger Behandlung mit einer rauhen Bürste und darauf folgendem Abspülen mit Wasser ist das Coenenchyma vollständig entfernt. Das Skelett wird sodann mit 1%iger Essigsäure in Gegenwart von Toluol bei 40° C extrahiert. (Halogenwasserstoffsäure ist zu vermeiden, wenn man in dem Produkt das Jod bestimmen will.) Die Säure wird in Zwischenräumen von einigen Tagen erneuert, bis die Extrakte kein Kalzium mehr enthalten. Diese Reinigung wird längere Zeit fortgesetzt und schließlich durch Dialyse vervollständigt. *C. Th. Moerner*[2]) fand bei seinen Untersuchungen der Gerüstsubstanz des Anthozoenskelettes das „Pennatulin" (der Pennatulazeen) in Pepsinsalzsäure löslich. Gorgoniakorallen spalten unter Einwirkung von Trypsinalkali bis zu 93% ihres Jodgehaltes ab[3]).

III. Proteinoide im Gerüst der Röhrenwürmer.

Aus den Hornröhrchen des Röhrenwurmes Onuphis tubicola gewann *Schmiedeberg*[4]) neben einem kohlenhydratartigen Körper, dem Onuphin, durch wiederholte Extraktion der Röhrchen mit Salzsäure und Kalilauge ein Proteinoid in Form von lockeren, papiermachéartigen Lamellen. Dieses Proteinoid stellt von den 42·39% organischer Substanz, welche die lufttrockenen Onuphisröhrchen enthalten, 3·84% dar. Auch in den Röhren der lederartigen Hülle von Spirographis Spalanzanii hat *Schmiedeberg* neben einem onuphisartigen einen Proteinoidbestandteil nachgewiesen. Er isolierte denselben durch aufeinander folgende Behandlung

---

[1]) *A. Oswald*: Gewinnung von 3.5-Dijodtyrosin aus Jodeiweiß IV. Die Verhältnisse bei Gorgonin und Spongin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**. 353 (1911). Vgl. auch ebenda **74**. 290.

[2]) *Carl Th. Moerner*: Zur Kenntnis der organischen Gerüstsubstanz des Anthozoënskelettes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**. 33 (1907); **55**. 77 (1908).

[3]) *A. Oswald*: Einwirkung von Trypsin auf 3.5-Dijodtyrosin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**. 432 (1909).

[4]) *O. Schmiedeberg*: Über die chemische Zusammensetzung der Wohnröhren von Onuphis tubicola Mueller. Mitt. a. d. Zool. Station zu Neapel. **3**. 373 bis 392 (1882).

mit Alkalilauge und Salzsäure. *Krukenberg*[1]) bezeichnete die nach dem Auskochen der Spirographishülle mit Wasser hinterbleibende, durch Trypsin nicht verdauliche Substanz als Spirographin. Er löste diese Substanz in starkem Alkali und erhielt bei der Neutralisation der Lösung ein weiteres Produkt, das Spirographein, welches beim Erhitzen mit Wasser unter Druck proteinoidartige Produkte und Brenzkatechin lieferte (?).

IV. Das Konchiolin.

Mit dem Namen Konchiolin bezeichnet *Frémy*[2]) die Gerüstsubstanz der Lamellibranchiaten. Diese Substanz ist von *Schloßberger*[3]), später von *Wetzel*[4]) untersucht worden und sicher nicht einheitlich.

Löst man nach *Schloßberger* die Muschelschale in verdünnter Salzsäure, so unterscheidet man an dem ungelöst bleibenden Schalenteil nach dem Aufschwemmen mit Wasser zweierlei Substanzen: 1. Braune, derbe, etwas durchscheinende Häute, die nach dem Waschen und Trocknen graugelb erscheinen, ziemlich kohärent und fast undurchsichtig sind, und 2. weißgraue, schleimige Flocken.

Wetzel verwandte zu seinen Untersuchungen die Schalen der Miesmuschel Mytilus edulis, und zwar der im Mittelmeer lebende Varietät galloprovincialis und die Schalen der riesigen roten Steckmuschel Pinna nobilis. Aus den Schalen der letzteren erhält man nach der Entkalkung mit verdünnter Salzsäure zwei verschiedene Produkte, welche mit den von *Schloßberger* erlangten beiden Produkten große Ähnlichkeit aufweisen.

Aus den Schalen von Austern erhält man das Konchiolin in folgender Weise: Fein zertrümmerte Schalen werden mit 0·3%iger Salzsäure entkalkt. Die Säure wird häufig erneuert, bis die Extrakte nur noch schwache Spuren von Kalzium aufweisen. Die Säure wird sodann zum größten Teil rasch weggewaschen und der organische Rückstand in Gegenwart von Toluol 24 Stunden lang

---

[1]) *E. Krukenberg*: Vgl. Studien. I. Reihe. 5. Abt. 28 bis 30 (1881); Zur Kenntnis der organischen Bestandteile der tierischen Gerüstsubstanz. Vgl. Studien. II. Reihe. 1. Abt. 49 bis 58 (1882).

[2]) *E. Frémy*: Recherches chimiques sur les Os. Compt. rend. de l'Acad. des sciences de Paris. **39**. 1053 bis 1058; Journ. f. prakt. Chem. **64**. 263 (1854); Ann. de Chimie. (3.) **43**. 96 bis 99 (1855).

[3]) *J. Schloßberger*: Zur Kenntnis der Muschelschalen des Byssus und der Chitinfrage. *Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **98**. 99 bis 120; Journ. f. prakt. Chem. **68**. 162 (1856).

[4]) *G. Wetzel*: Über die Spaltungsprodukte des Konchiolins. Zentralbl. f. Physiol. **13**. 113 und 114 (1899); Die organischen Substanzen der Schalen von Mytilus und Pinna. Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 388 (1900).

der Einwirkung 1%iger Natronlauge unterworfen. Der Rückstand wird mehrmals zum Zwecke der Entfernung der anhaftenden löslichen Substanzen einschließlich Alkali mit Wasser gewaschen und dann in einer 0·25%igen Sodalösung über Nacht bei 40° der tryptischen Verdauung unterworfen. Der größte Teil der anhaftenden löslichen Substanzen und der Soda wird alsdann mit Wasser entfernt und der Rückstand unter Einwirkung von Pepsinsalzsäure (0·2%) über Nacht bei 40° digeriert. Der Rückstand wird nun abermals mit 0·1%iger Salzsäure von Eiweiß frei gewaschen und in Wasser unter Toluol dialysiert, bis er vollständig säure- und calciumfrei geworden ist. Dieses Produkt, eine Mischung der beiden „Konchioline", wird jetzt mit warmem Alkohol und Alkoholäther gewaschen und schließlich mit Äther in einem *Soxhlet*-Apparat zur vollständigen Entfernung von Lipoidsubstanzen extrahiert. Das trockene Material ist gewöhnlich eine harte bräunliche Masse, welche leicht zu einem feinen Pulver zerrieben werden kann.

V. Der Byssus.

Der Byssus ist die Substanz, mit welcher sich die Azephalen an Fremdkörper anheften. Er ist offenbar das Sekret einer Byssusdrüse und besteht aus braunen Fäden. Gereinigt wird er am einfachsten durch Auswaschen mit Wasser und mehrmaliges Spülen mit Alkohol und Äther. Angaben über seine Löslichkeit in Mineralsäuren und Laugen hat *Schloßberger*[1]) gemacht.

Bei der Totalhydrolyse des Byssus von Pinn anobilis L. fand *E. Abderhalden*[2]) folgendes: Der Byssus enthält viel Glykokoll und l-Tyrosin, ferner d-Alanin, l-Asparaginsäure und auffallend viel Prolin. Vorhanden sind höchstwahrscheinlich Valin, Leuzin und Phenylalanin.

VI. Die Seide.

Die Seide ist ein von Lepidopterenraupen behufs Bildung der Kokons abgesondertes Sekret. Am eingehendsten untersucht ist die Seide von Bombyx mori, dem Seidenspinner. Das Sekret selbst läßt sich darstellen, indem man frische Seidendrüsen mit 15%iger Pottaschelösung mazeriert. Man erhält hiebei eine Flüssigkeit, die beim Schütteln ein Gerinnsel absetzt. Dieselbe Erscheinung tritt auch unter Luftabschluß ein, besser aber bei Gegenwart von Sauerstoff (*Dubois*[3]). Trägt man den Seidensaft in Alkohol ein,

---

[1]) *J. Schloßberger*: Zur Kenntnis der Muschelschalen, des Byssus und der Chitinfrage. Ann. d. Chem. u. Pharm. **98**. 109 bis 114 (1856).

[2]) *E. Abderhalden*: Die Monoaminosäuren des „Byssus" von Pinna nobilis L. Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**. 236 (1908).

[3]) *R. Dubois*: Zur la sécrétion de la soie chez Bombyx mori. Compt. rend. **111**. 206 (1890).

so erstarrt er (*Bolley*[1]). Durch Auskochen mit Wasser läßt sich die Seide in zwei Teile zerlegen, das Fibroin, welches unverändert zurückbleibt, und den Seidenleim (Serizin), welcher in Lösung geht. Zur Darstellung des Fibroins verfährt man in folgender Weise (Methode von *Cramer*, modifiziert von *Emil Fischer*[2]): Man erhitzt gelbe Rohseide oder technisch degommierte Seide in einem 5 *l* fassenden Porzellantopf von der Form eines Becherglases in einem Autoklaven mit der 25fachen Menge Wasser drei Stunden auf 117 bis 120°. Diese Operation wird ein- bis zweimal wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfindet. Bei technisch degommierter Seide genügt zweimaliges Kochen mit Wasser. Die Menge des rückständigen Fibroins beträgt 68·5% der angewandten Rohseide.

Das Fibroin kann zur weiteren Reinigung 24 Stunden lang in 1%iger Salzsäure eingeweicht werden. Sodann wird es mit Wasser vollständig frei von Serizin und Säure gewaschen, mit Alkohol entwässert und schließlich mit Äther in einem *Soxhlet*-Apparat von Lipoiden befreit (*Bondi*[3]).

Nach *Fischers* Angaben besitzt derartig dargestelltes Fibroin wesentlich andere Eigenschaften als dasjenige, welches nach *Städeler*[4]) durch Behandlung mit 5%iger Natronlauge entsteht.

Die Resultate der Totalhydrolyse vgl. bei *Fischer* und *Skita*[5]).

Der Seidenleim (Serizin) wird nach *Cramer*[6]) gewonnen, indem man die durch Auskochen gelber Rohseide mit Wasser über 100° erhaltene Lösung noch warm mit basischem Bleiazetat fällt, den Niederschlag abfiltriert und auswäscht, bis das Filtrat bleifrei ist, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelblei abfiltriert und das Filtrat mit Alkohol fällt. Die ausgefallenen weißen Flocken

---

[1]) *Bolley*: Zur Genesis der Seide. Journ. f. prakt. Chemie. **93**. 347 (1864).

[2]) *E. Fischer* und *A. Skita*: Über das Fibroin der Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 177 (1901); **35**. 221 (1902); vgl. auch *E. Abderhalden*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**. 401 (1909) sowie **72**. 1 (1911) und *E. Fischer* und *E. Abderhalden*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**. 752, 2315. (Gewinnung von Polypeptiden aus Fibroin.)

[3]) *S. Bondi*: Studien über Seidenleim. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**. 481 (1902).

[4]) *G. Städeler*: Untersuchungen über Fibroin, Spongin und Chitin. Ann. f. Chem. u. Pharm. **111**. 12 bis 16 (1859).

[5]) *E. Fischer* und *A. Skita*: Über das Fibroin der Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 177 (1901); **35**. 221 (1902); vgl. auch *E. Abderhalden*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**. 401 (1909) sowie **72**. 1 (1911) und *E. Fischer* und *E. Abderhalden*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**. 752, 2315.) Gewinnung von Polypeptiden aus Fibroin.).

[6]) *E. Cramer*: Über die Bestandteile der Seide. Journ. f. prakt. Chem. **96**. 76 bis 77 (1865).

werden mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet (*Wetzel*[1]). Nach *Fischer*[2]) (l. c.) stellt man den Seidenleim als Rohprodukt in der Weise dar, daß man gelbe lombardische Rohseide zweimal mit 125 Teilen Wasser jedesmal drei Stunden im Autoklaven im großen Porzellanbecher auf 118° erhitzt und dann die wässerige Lösung eindampft. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt ungefähr 25% der Rohseide und stellt eine dunkle glasige, leimähnliche Masse dar.

Nach *Bondi* (l. c.) gewinnt man Seidenleim auch in folgender Weise: Die Seidenkokons werden mit der Schere geöffnet und von den Puppen befreit, hierauf sorgfältig von den ihnen noch anhaftenden Verunreinigungen und Puppenresten gesäubert. Kokons, die nicht vollständig davon zu befreien sind, werden nicht verwandt. Die Seidenkokons werden zwei Tage mit gewöhnlichem Wasser und dann in 1%igen Salzsäurebädern geweicht, in welchen sie 24 Stunden liegen bleiben. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit werden die Kokons, solange noch Säurereaktion nachweisbar ist, in fließendem Leitungswasser, nach dem Verschwinden der Säurereaktion mit oft zu wechselndem destillierten Wasser chlorfrei gewaschen.

Nun wird durch Kochen der Kokons mit Wasser, am besten in einem Glaskolben mit Rückflußkühler, das Serizin in Lösung gebracht. Bei gleichzeitiger Verarbeitung größerer Mengen kann auch in einem emaillierten oder verzinkten Metallkessel gekocht werden. (Vgl. *Fischers* Angaben.) Es ist darauf zu achten, daß durch öfteres Zuführen von Wasser das Flüssigkeitsniveau sich stets auf der gleichen Höhe hält, da sonst an den Kesselwänden über der Flüssigkeit schwer lösliches Serizin sich festsetzt.

Die Kokonmenge wird zwei- oder dreimal, aber immer nur eine Stunde gekocht; durch längeres Kochen kann die Gelatinierfähigkeit des Serizins beeinträchtigt werden. Beim Kochen wird 20- oder 30mal soviel Wasser verwandt als das Gewicht der trockenen Kokons beträgt. Der Versuch, ein viertesmal die Kokons zu kochen, ist wertlos, denn die dabei erhaltene Lösung enthält nur noch 1 bis 2‰ Serizin.

Die heiße Lösung wird von den Kokons abgegossen und durch ein Wärmefilter filtriert, da beim Erkalten leicht fein verteilte Ausscheidungen entstehen. Das Filtrat wird in Porzellanschalen auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand haftet

---

[1]) *G. Wetzel*: Ein Beitrag zur Kenntnis der in der Seide enthaltenen eiweißartigen Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 535 bis 542 (1899).

[2]) *E. Fischer*: Nachtrag zur Hydrolyse des Kaseins und Seidenfibroins durch Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 155 (1908).

der Schale in Form von spröden gelbbraunen Lamellen an, und lassen sich dieselben am besten mit einem Metallspatel herunternehmen. Er wird in der Reibschale zerrieben und stellt dann ein gefärbtes grobes Pulver dar, welches sich zur weiteren Reinigung besser eignet als größere Stücke, indem es den Reinigungsflüssigkeiten eine viel ausgiebigere Einwirkung gestattet.

Je 30 bis 40 *g* des gepulverten Seidenleimes werden in einem Becherglas mit einem Liter destillierten Wassers übergossen, mit einem Rührer vorsichtig aufgeführt und einen Tag lang mit dem Wasser in Berührung gelassen. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit wird der Vorgang unter erneutem Wasserzusatz zwei- oder dreimal wiederholt. In ähnlicher Weise wird der so gewaschene Leim mit 1%iger Kalilauge durch zwei Tage behandelt, worauf Waschen mit destilliertem Wasser, einmalige kurzdauernde Waschung mit verdünnter Essigsäure behufs Neutralisation des Alkalis und schließlich mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser folgen. Der Seidenleim quillt bei der Reinigung sehr stark. Zwei bis drei Tage langes Stehenlassen unter täglich gewechseltem Alkohol bringt das Präparat wieder auf das ursprüngliche Volumen. Hiebei geht schon ein Teil des Farbstoffes in den Alkohol über. Die vollständige Befreiung von färbenden Bestandteilen gelingt durch einstündiges Kochen mit 70 bis 80%igem Alkohol. Um die geringe Menge des anhaftenden Fettes sowie den Alkohol vollständig zu beseitigen, wird das Pulver noch mehrere Tage mit wasserfreiem Äther extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers erhält man das reine Serizin in Form eines nicht mehr oder nur noch wenig gefärbten Pulvers. Dieses Produkt ist jedoch ein Gemisch der in Wasser leicht löslichen Serizinmodifikation und der schwer löslichen Modifikation, welche durch das Eindampfen entstanden ist. Zur Isolierung des leicht löslichen Serizins wird eine kleine Menge des Pulvers in einem Glaskolben mit Steigrohr mit der 20fachen Menge Wasser auf dem Wasserbad zwei Stunden lang erhitzt. Die Flüssigkeit wird noch heiß abfiltriert und nach dem Erkalten mit einer mehrfachen Menge Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden läßt sich die überstehende Flüssigkeit größtenteils vom Niederschlag abgießen. Gut ist es, den Niederschlag noch weitere 24 Stunden mit absolutem Alkohol stehen zu lassen und erst dann zu filtrieren. Man wäscht mit wasserfreiem Äther nach und bringt den nach Abtropfen der Flüssigkeit konsistenter gewordenen Niederschlag in ein Schälchen, digeriert mit wasserfreiem Äther, gießt diesen ab und bringt nun das Schälchen zum Eintrocknen in eine Glasglocke über Chlorkalzium. Nach Verlauf einer Woche lassen sich die durch starkes Schrumpfen entstandenen weißen Scdollen zerreiben. Der Seidenleim wird stets in Form eines ungefärbten Pulvers erhalten, welches in heißem Wasser vollständig löslich ist. Diese Lösung gibt alle Reaktionen

des Seidenleimes und bildet nach dem Erkalten bei genügender Konzentration eine feste Gallerte.

Bondi gibt auch folgende ökonomischere und raschere Methode an: Man setzt dem Dekokt der Seidenkokons (welches 0·5 bis 1 *l* betragen mag) vorsichtig, am besten kubikzentimeterweise, 1%ige Essigsäure zu. Nach Zusatz jedes Kubikzentimeters rühre man um und warte einige Zeit. Hat man genug Essigsäure zugesetzt (4 bis 8 *cm*), so findet eine Abscheidung des Seidenleimes statt. Es setzt sich in Form größerer Flocken zu Boden, während die überstehende Flüssigkeit klar und farblos wird.

Durch tagelanges Dekantieren des Niederschlages mit destilliertem Wasser kann man ihn von der Essigsäure und auch noch von viel Asche befreien. Den hiebei ziemlich gequollenen Flocken läßt sich durch Übergießen mit Alkohol und mehrmaligen Wechsel desselben sehr viel Wasser entziehen. Auskochen in Alkohol nimmt den Farbstoff fort. Die noch mit Äther behandelte Masse läßt man dann über Chlorkalzium eintrocknen. Es entsteht ein farbloses Produkt, welches zu Pulver zerrieben wird. Das Pulver gleicht, soweit es bisher untersucht wurde, der leicht löslichen Modifikation des Seidenleimes; es ist in heißem Wasser löslich, die Lösung gibt die Reaktionen des Seidenleimes und erstarrt bei genügender Konzentration zu einer Gallerte.

Kurz erwähnt sei hier, daß auch aus sogenannter wilder Seide in ähnlicher Weise Fibroin und Serizin gewonnen worden sind (*Bolley*[1]), *Bastow* und *Appleyard*[2]). Hydrolysen „wilder Seiden" geben *Suzuki*, *Yoshimura* und *Inouyé*[3]) an.

E. Abderhalden und *Auguste Rilliet*[4]) haben in neuester Zeit die „New-Chwang"-Seide untersucht und das rohe Gespinnst folgendermaßen gereinigt: Zuerst wurde die ungefärbte Seide mechanisch durch Zerzupfen und Ausschütteln von Staub und sonstigen Beimengungen sorgfältig befreit. Dann wurde das Gewicht der Seide festgestellt und nunmehr der Seidenleim durch Auskochen mit Wasser in einem Porzellangefäß im Autoklaven (vgl. *Fischers* Methode) entfernt. Das Wasser wurde so lange erneuert, bis beim Eindampfen kein erheblicher Rückstand mehr blieb. Etwas ging immer noch in Lösung. Es scheint, daß das

---

[1]) *Bolley*: Untersuchungen über Jama-may-Seide. Journ. f. prakt. Chem. **108**. 364 (1869).

[2]) *E. Bastow* und *J. R. Appleyard*: Zur Chemie der Tussaseide. Chem.-Ztg. **12**. 209 (1888).

[3]) *U. Suzuki, K. Yoshimura* und *R. Inouyé*: Die Hydrolyse „wilder Seiden" (Sakusan, Yamamai, Curiwata). Journ. of the Coll. of Agric. Tokio. **1**. 59 (1909).

[4]) *E. Abderhalden* und *Auguste Rilliet*: Die Monaminosäuren der „New-Chwang"-Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**. 337 (1909).

Seidenfibroin trotz aller Vorsichtsmaßregeln — Anwendung von destilliertem Wasser und Benützung eines Porzellangefäßes — beim Erhitzen mit Wasser unter Druck angegriffen wird. Die Seide verlor nach viermaligem, drei- bis fünfstündigem Auskochen mit je 3 bis 4 *l* Wasser 20% Leim, beim Trocknen bei 120° verlor sie durchschnittlich 10% an Gewicht. Sie enthielt zirka 5% Asche, in welcher Eisen, Kalzium, Phosphorsäure und Salzsäure qualitativ nachgewiesen werden konnten. *E. Abderhalden*[1]) hat in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern eine größere Zahl verschiedener Seidearten untersucht und auf ihre Zusammensetzung verglichen.

Erwähnt sei noch die Untersuchung von *Emil Fischer* über die Zusammensetzung der Seide der Spinne Nephila madagascariensis[2]).

Gleichfalls erwähnt werden möge ein Produkt des Follikelepithels des Ovariums von Bombyx mori, welches *Tichomiroff*[3]) darstellte, indem er es von anderen morphologischen Beimengungen durch Digerieren mit 0·1% Salzsäure, sodann durch Erwärmen auf dem Wasserbad und nachfolgende Verdauung mit Pepsinsalzsäure befreite.

B. Die Proteinoide der Vertebraten.

I. Das Kollagen und der Leim.

Das Kollagen bildet die Hauptmenge der die Bindegewebszellen umgebenden Grundsubstanz im lockeren Bindegewebe, in den Faszien, Bändern, ferner die organische Grundsubstanz der Knochen und einen Teil derselben in der Kornea und in den Fischschuppen.

1. Zur Darstellung von Knochenkollagen verwendet man am besten Schenkelknochen des Ochsen. Dieselben werden sorgfältig auf mechanischem Wege zunächst von den anhaftenden Geweben und vom Periost befreit und die reinen Knochen sodann durch Eintauchen in große Mengen verdünnter Säure (0·1 bis 0·2%ige Salzsäure) entkalkt. Stärkere Säuren bewirken leichtere Zersetzlichkeit des Kollagens. Nach sechsstündiger Einwirkung der Säure ist besonders bei gelegentlichem Umrühren der Säure die Oberfläche der Knochen merklich entkalkt, und durch Ab-

---

[1]) Abhandlungen in der Zeitschr. f. physiol. Chem. 58 bis 80 (1909 bis 1912).

[2]) *E. Fischer*: Über Spinnenseide. Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**. 137 (1907).

[3]) *A. Tichomiroff*: Chemische Studien über die Entwicklung der Insekteneier. Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**. 518 und 566 (1885).

kratzen mit einem gewöhnlichen Skalpell können lange Stücke elastischer Späne von Ossein erhalten werden.

Durch abermaliges Eintauchen in frische Säure wird eine weitere Schicht entkalkt; der Prozeß kann zweimal im Tage wiederholt und so weit geleitet werden, daß der Knochen vollständig entkalkt und in Osseinspäne umgewandelt ist. Die ersten drei oder vier Portionen der Osseinspäne sollten aus dem weiteren Gang der Präparation ausgeschaltet werden, um sicher zu gehen, daß alle anhaftenden Stoffe entfernt sind. Jede Portion der Späne muß in einer Fleischmaschine zerkleinert und von den unorganischen Stoffen durch Behandeln mit 0·05 bis 0·01%iger häufig erneuerter Salzsäure oder durch Dialyse in Salzsäure oder durch beides befreit werden. Diese Behandlung zur Entfernung aller oder nahezu aller unorganischen Substanzen ist zu der nun folgenden vollständigen Entfernung des Mukoides nötig. Nach Sammlung der gewünschten Menge des mit Säure gewaschenen Osseins muß dieses vom Osseomukoid befreit werden[1]). Dies geschieht am besten in der Weise, daß man zuerst die Substanz wiederholt einige Tage mit viel Wasser wäscht, bis alle Säure entfernt ist, und sie dann in verschlossenen Flaschen einer Extraktion mit einem großen Überschuß von 0·05 bis 0·1%iger Natronlauge (10 bis 15 cm^3 Lösung pro Gramm) unterwirft. Zu den Extrakten setzt man Toluol zu, schüttelt kräftig und erneuert das Alkali mehreremal in einem Zwischenraum von 48 bis 72 Stunden. Das verdünnte Alkali entfernt nicht nur alles Osseomukoid, sondern auch anhaftende Spuren von Nukleoprotein- und Hämoglobinzersetzungsprodukten; es verändert das Osseokollagen nicht. Man entfernt sodann elastische Fasern, Osseoproteinoid[2]), Rückstände von Blutgefäßen usw., indem man das Ossein der Einwirkung einer stark aktiven Trypsinalkalilösung (0·25% Soda) bei 38 bis 40% unterwirft. (Dieser Prozeß darf nicht vor der Entfernung des Osseomukoides in Anwendung kommen. Vgl. *Posner* und *Gies*[3].) Die Digestion wird vier bis fünf Tage unter Gegenwart von Toluol mit täglicher Erneuerung der Trypsinflüssigkeit fortgesetzt.

Am Ende des tryptischen Verdauungsprozesses, der das Kollagen nicht merklich beeinflußt, ist das Ossein frei von allen Proteinen mit Ausnahme des Osseokollagens selbst. Die schuppigen

[1]) *Hawk* und *Gies*: Chemical studies of osseomucoid, with determinations of the heat of combustion of some connective tissue glucoproteids. Amer. Journ. of Physiol. **5.** 387 (1901); *Seifert* und *Gies*: On the distribution of osseomucoid. Ibid. **10.** 146 (1903).

[2]) *Hawk* und *Gies*: On the composition and chemical properties of osseoalbumoid, with a comparative study of the albumoid of cartilage. Amer. Journ. of Physiol. **7.** 340 (1902).

[3]) *Posner* und *Gies*: Vorläufige Untersuchung über die Verdaulichkeit des Bindegewebsmukoids in Pepsinsalzsäure. Amer. Journ. of Physiol. **11.** 330 (1904).

Teile besitzen trotzdem noch fast alle ihre ursprünglichen Eigenschaften. Man reinigt dieselben von verschiedenen Digestionsprodukten sorgfältig durch wiederholtes und langes Auswaschen, zuerst mit großen Mengen von 0·05%iger Salzsäure und dann mit Wasser in Gegenwart von Toluol. Nun wird das säurefreie Produkt an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet. Die gelben Schuppen werden dann gepulvert. Das gepulverte Material wird in Wasser aufgeweicht und wieder mehrmals in 0·05%iger Salzsäure gewaschen und in Säure dialysiert — beides in Gegenwart von Toluol —, bis in den Außenwässern der Dialyse keine unorganischen Bestandteile mehr nachweisbar sind. Das Pulver wird sodann aufeinander folgend mit Alkohol, Alkoholäther und schließlich mit Äther behandelt, um Lipoide zu entfernen und es zu entwässern. Die Ätherextraktion muß sorgfältig ausgeführt werden, da in den Partikeln beträchtliche Mengen von ätherlöslicher Substanz zurückbleiben. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, bildet das Endprodukt ein weißes oder gelbliches Pulver. (*Gies* hat gefunden, daß in dieser Weise präparierte Produkte eine Elementarzusammensetzung haben, welche praktisch mit der des Sehnenkollagens identisch ist; auch hat er beobachtet, daß die Elementarzusammensetzung des Glutins aus Sehnenkollagen praktisch dieselbe ist, wie die des Glutins aus Osseokollagen.) (Nicht veröffentlicht.)

2. Zur Darstellung von Sehnenkollagen wählt man am besten als Ausgangsmaterial die Achillessehne des Ochsen. Das Material wird von anhaftendem Gewebe sorgfältig befreit und in sehr dünne transversale Stücke geschnitten. Zur Zerkleinerung ist es nötig, lange, scharfe und sehr dünne Messer zu verwenden. Die groben Stücke werden nun zunächst mit Wasser blutfrei gewaschen. Will man gleichzeitig das Sehnenmukoid aus den folgenden Alkaliextrakten erhalten, so ist es nötig, diesen Waschprozeß in verschlossenen Flaschen unter Gegenwart von Toluol vorzunehmen, bis kein Hämoglobin oder koagulables Eiweiß mehr ausgezogen werden kann (*Posner* und *Gies*[1]). Sodann werden die Stücke einer zirka vier Tage dauernden Extraktion mit einer täglich mehrmals gewechselten 0·05 bis 0·1%igen Natronlauge unter Toluolzusatz unterzogen, um so noch anhaftende Spuren von Blut und Lymphe zu entfernen und das Sehnenmukoid abzutrennen. Letzteres erhält man aus diesem Extrakt durch Behandlung mit einem mäßigen Überschuß von 0·2%iger Salzsäure (*Cutter* und *Gies*[2]). Elastische Fasern (*Bürger* und *Gies*[3]), Über-

[1]) *Posner* und *Gies*: Verbinden sich die Mukoide mit anderen Proteinstoffen? Amer. Journ. of Physiol. **11**. 404 (1904).

[2]) *Cutler* und *Gies*: The composition of tendon mucoid. Amer. Journ. of Physiol. **6**. 155 (1901).

[3]) *Bürger* und *Gies*: The chemical constituents of tendinous tissue. Amer. Journ. of Physiol. **6**. 219 (1901).

bleibsel von Blutgefäßen usw. werden sodann in derselben Weise, wie oben für das Ossein beschrieben, durch tryptische Verdauung entfernt, wobei auch hier die Sehnenstücke ihr Aussehen nicht verändern. Zu Ende des tryptischen Prozesses hinterbleibt nichts außer Sehnenkollagen. Nun werden die Sehnenstücke in der Fleischhackmaschine zerkleinert. (Dieses darf wegen des leichten Zusammenballens des Materials in alkalischen Flüssigkeiten erst an dieser Stelle vorgenommen werden.) Das Material wird jetzt durch lang anhaltendes Waschen mit Wasser und schließliche Dialyse von allen anhaftenden Substanzen befreit. In dieser Form kann es, wie auch das beschriebene Osseokollagen, zur Darstellung des betreffenden Glutins dienen. Nach sorgfältiger Entfernung unorganischer Stoffe wird das faserige Kollagen sorgfältig mit Alkoholäther und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es besteht schließlich aus einer schneeweißen Masse sehr dünner Fasern. Das so erhaltene Produkt hat angenähert dieselbe Elementarzusammensetzung und Verbrennungswärme, wie das daraus dargestellte Sehnenglutin (*Manning* und *Gies*[1]), *Emmet* und *Gies*[2]).

3. Aus Sehnen läßt sich das Kollagen nach *Sadikoff*[3]) auch gewinnen, wenn man die fein zerhackten Sehnen mit schwacher Alkalilösung behandelt, mit kaltem Wasser wäscht und die Masse mit einem Glasstab unter Wirbelbewegungen schlägt. Man kann dabei die ganze Kollagenmenge um den Glasstab zusammenwinden.

4. Aus der Hornhaut des Auges erhält man das Kollagen nach *Mörner*[4]) in folgender Weise: Man schneidet den mit der Hornhaut zusammenhängenden Teil der Sehnenhaut ab, schabt das Epithellager und die *Descemet*sche Haut mit einem Hornmesser ab, zerkleinert die aus Grundsubstanz bestehenden Scheiben in der Fleischhackmaschine und extrahiert in schwacher Alkalilösung (0·02% Kalilauge oder 0·02 bis 0·2% Ammoniak, in Partien von 100 bis 300 Stück) zwei bis drei Tage lang bei Zimmertemperatur. Sobald die Reste bei öfterem Wechsel der Flüssigkeit

[1]) *Manning* und *Gies*: Proc. of the soc. for exper. Biol. and Med. **4**. 160 (1907).

[2]) *Emmet* und *Gies*: Relation of Collagen and Gelatin. Proc. of the Amer. soc. of Biol. Chem. **1**. 42 (1907); Journ. of Biol. Chem. **3**. 33 (1907); Amer. Journ. of Physiol. **19**. 11 (1907); vgl. auch *F. Hofmeister*: Über die chemische Struktur des Kollagens. Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**. 299 bis 322 (1878). Ferner *Gies*: Proc. of the Amer. Chem. Soc. Biol. Sect., Science. **24**. 463 (1907).

[3]) *W. L. Sadikoff*: Untersuchungen über tierische Leimstoffe. V. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 130 bis 139 (1906).

[4]) *C. Th. Mörner*: Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**. 213 bis 256 und 61 bis 106 (1894).

keine durch Essigsäure fällbare Substanz mehr abgeben, werden sie durch Behandlung mit destilliertem Wasser erst bei Zimmertemperatur, später bei 30 bis 40° vollständig von Alkali befreit. Die reinweiße gleichartige Masse kann nun durch stundenlanges Erwärmen mit destilliertem Wasser bei 105 bis 111° in eine klare dünnflüssige, bei Abkühlung gelatinierende Lösung verwandelt werden oder aber durch Alkohol- und Ätherbehandlung zur Trockne gebracht werden.

Die Kollagene gehen durch Lösen in siedendem Wasser in Glutine über, welche bei Zimmertemperatur zu Gallerten erstarren.

1. Sehnenglutin. Zur Darstellung des Glutins aus Sehnen verwendet man das Sehnenkollagen, welches in der bereits beschriebenen Weise dargestellt ist, und unterwirft es vor seiner Behandlung mit Alkohol und Äther (*Tebb*[1]) direkt der Einwirkung von Wasser. Das Wasser wird zweckmäßig mit einer sehr geringen Menge Salzsäure angesäuert (*Emmett* und *Gies*, l. c.). Das Gemisch wird nun am Rückflußkühler gekocht. In Intervallen von einer Stunde gießt man die Lösung ab und ersetzt sie durch frisches, schwach angesäuertes Wasser. Dieser Prozeß wird fortgesetzt, bis alles Kollagen in Glutin übergegangen ist. Die Glutinlösung wird nun möglichst neutralisiert, durch rasche Verdampfung auf dem Wasserbad stark eingeengt und schließlich mit so viel Alkohol versetzt, daß eine reichliche, aber unvollständige Fällung entsteht. Es bilden sich stets während des Umbildungsprozesses des Kollagens in Glutin Glutosen. Wenn die gerade eben nötige Menge von Alkohol zur Fällung des Glutins angewendet wird, so bleibt die größte Menge der Glutinosen in Lösung. Zweckmäßigerweise löst man die Niederschläge abermals in Wasser und fällt nochmals mehrere Male wie beschrieben. Von der letzten Fällung filtriert man die Lösung durch ein Heißwasserfilter und dialysiert einige Tage lang unter Gegenwart von Toluol gegen fließendes Wasser. Zur endgültigen Fällung ist es am besten, den Niederschlag in möglichst wenig Wasser unter Erwärmung zu lösen, so daß eine dicke visköse Lösung entsteht. Läßt man dieselbe ein wenig erkalten und gießt sie sodann in dünnem Strahl in ein 15- bis 20faches Volumen 90- bis 95%igen Alkohols, so erstarrt die Masse und das ganze Glutin verwandelt sich in eine voluminöse weiße fibröse Masse, welche sich an einen Stab beim Rühren anhaftet und so aus der Alkoholflüssigkeit herausgenommen werden kann.

Diese so gewonnenen Glutinstreifen wäscht man sodann mit frischem Alkohol, welcher sie etwas steifer und härter macht. Sodann extrahiert man sie wiederholt mit Äther zur Entfernung von Lipoiden

[1]) *Tebb*: Journ. of Physiol. **27**. 463 (1892).

und Alkohol und trocknet sie schließlich im Vakuumexsikkator (*Van Name*[1]), *Sadikoff*[2]).

2. Reinigung nach *Mörner*. Zur Reinigung der käuflichen Gelatine dient folgende Vorschrift: Die Gelatinescheiben werden während einiger Tage mit ätherhaltigem, destilliertem Wasser (zu antiseptischen Zwecken) ausgewaschen, dann mit Kalilauge (von einem bis ein paar Zehntel Prozent) während einiger Wochen oder bis das Glutin so locker geworden ist, daß bei einem Durchsieben ein nennenswerter Verlust eintritt, danach mit destilliertem Wasser, sehr verdünnter Essigsäure und schließlich wieder mit destilliertem Wasser behandelt. Das Auswaschen findet bei Zimmertemperatur statt, die Erneuerung der Extraktionsflüssigkeit — 1 *l* auf 25 bis 30 *g* Glutin — geschieht täglich oder jeden zweiten Tag, wobei die Gallerte vermittelst eines porzellanenen Siebes gesammelt wird. Nachdem die stark gequollene Gelatine mit Alkohol gehärtet worden ist (gewöhnlich ist zwei- bis dreimalige Erneuerung des Alkohols erforderlich), erhält man die Gelatinmasse in erstarrtem Zustande. Sie kann, falls der spezielle Zweck dies benötigt, wiederum durch Lösen in warmem Wasser, Filtrieren und Fällen mit Alkohol, Trocknen, Pulverisieren, Extraktion mit Äther usw. behandelt werden. Als Endprodukt erhält man bei diesem Verfahren ein Glutin, welches eine beachtungswerte Garantie für die Abwesenheit nahezu jeder Verunreinigung darbietet, — ausgenommen einen gewöhnlich nicht hochgradigen (0·25 bis 0·75%) Gehalt an mineralischen Bestandteilen — und das zugleich keiner chemischen Veränderung unterzogen worden ist. Wünscht man das demgemäß von organischen fremden Stoffen befreite Glutin möglichst aschearm darzustellen, so wird in der Wärme eine starke (10 bis 15%) wässerige Lösung bereitet und behufs Gelatinierens abseits gestellt. Die Gallerte wird in dünne Scheibchen zerschnitten, welche Wochen hindurch mit reichlichem, oftmals erneuertem (ätherhaltigem), destilliertem Wasser ausgewaschen werden. Der Gehalt an Asche kann hiedurch von 1·87% in der ursprünglichen Gelatine auf 1·16 bis 0·13% im Glutinpräparat herabgesetzt werden (*Mörner*)[3]). *Dhéré* und *Gorgolewski*[4]) gewinnen ein von Mineralbestandteilen

---

[1]) *Van Name*: Journ. of exper. Med. **2.** 117 (1897).

[2]) *W. L. Sadikoff*: Untersuchungen über tierische Leimstoffe. I., II. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39.** 396 bis 422 (1903); vgl. auch Chem. Zentralbl. **1910.** I. 2. 1433 und 1437. Ferner: Über das Verhalten der Kollaine gegen Schwefelkohlenstoff. Journ. d. Russ. physiol. Ges. **41.** 1597 (1909).

[3]) *C. Th. Mörner*: Beitrag zur Kenntnis einiger Eigenschaften des Glutins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28.** 471 bis 523 (1899). (Mit ausführlichem Literaturverzeichnis.)

[4]) *Ch. Dhéré* und *Gorgolewski*: Über die Darstellung und einige physikochemischen Eigenschaften der von anorganischen Bestandteilen befreiten Gelatine. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **150.** 934 (1910).

völlig freies Glutin durch eineinhalb- bis dreimonatliche Dialyse gegen destilliertes Wasser oder (besser) durch Ausfrierenlassen einer 5%igen Gelatinelösung im Kältegemisch. Noch vorhandene geringe Aschespuren werden durch Elektrolyse entfernt.

3. Knochenglutin nach *Sadikoff*. Eine Methode zur Reindarstellung des Glutins gibt *Sadikoff*[1]) an: Nicht entfettete Knochen werden zerkleinert, eventuell zu einer breiartigen Masse zerquetscht. Der Brei wird dann mit Salzsäure (1 : 3) so lange behandelt, als noch Salze extrahiert werden können. Dies geschieht unter Umrühren und mehrmaligem Wechsel der Säure. Die auf der Oberfläche sich abscheidende Fettschicht wird abgehoben und die hyaline Masse, die nach sieben bis acht Tagen ziemlich vollständig von Salzen und Fett befreit ist, einigemal mit kaltem Wasser nachgewaschen und in eine 1- bis 3%ige Lösung von Natronlauge eingetragen. Hiebei lösen sich alle Proteinoidstoffe, Muzin, Nukleoproteide usw. Außerdem geht eine Verseifung der geringen noch anhaftenden Fettreste vor sich, und Überreste des phosphorsauren Kalziums fallen aus. Nach dreimaligem Wechsel der Alkalilösung und kurzem Nachwaschen mit Wasser sind alle eventuell noch anhaftenden Eiweißsubstanzen und Seifen beseitigt. Die Glutinmasse wird in eine siedende 1%ige Lösung von Monochloressigsäure gebracht; hiebei wandelt sich die leimgebende Substanz in den Leimstoff um. Die heiße konzentrierte Lösung wird durchgeschlagen, eventuell abfiltriert, mit Magnesiumsulfat ausgesalzen und mit kaltem Wasser und Alkohol von Säuren und Salzen befreit.

4. Reinigung nach *Sadikoff*. Eine weitere Reindarstellung des normalen Glutins schildert der genannte Autor (l. c.) in folgender Vorschrift: Glutin wird mit kaltem Wasser, darauf mit kalter 20%iger Lösung von Magnesiumsulfat gewaschen, dann unter Erwärmung auf dem Wasserbad in 20%iger Magnesiumsulfatlösung gelöst und heiß filtriert. Nach dem Erkalten wird ohne vorheriges Filtrieren 0·5%ige Mineralsäure, welche in 20%iger Magnesiumsulfatlösung bereitet ist, hinzugegeben. Die voluminöse Fällung wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, dann in heißem Wasser gelöst, abgekühlt und mit schwacher Salzsäure versetzt, wobei die Gesamtkonzentration der Salzsäure 1% nicht übersteigen darf. Man gibt dann drei bis vier Volumina starken Alkohols hinzu, so daß der Leimstoff in 70- bis 80%igem Alkohol gelöst ist. Man schlägt das gesamte Glutin durch Neutralisation mit Ammoniak nieder, läßt absitzen, gießt den Alkohol ab und wäscht mit Wasser oder Alkohol nach.

[1]) l. c.

Vgl. über die Totalhydrolyse des Leimes *Fischer*, *Levene* und *Aders*[1]), *Abderhalden*[2]), *E. Hart*[3]) und *E. Fischer*[4]), *E. Fischer* und *R. Böhner*[5]), *A. Kossel* und *F. Weiß*[6]), *E. Abderhalden* und *R. Kautsch*[7]).

II. Retikulin.

Das Retikulin, welches möglicherweise nur ein verändertes, schwerer in Glutin überführbares Kollagen ist (*Tebb*[8]), stellte *Siegfried*[9]) aus der Mukosa des Schweinedünndarmes dar. Es ist nach *Siegfried* die Grundsubstanz des retikulären (adenoiden) Bindegewebes und findet sich, außer in der Darmmukosa, in den Lymphdrüsen, der Leber, der Niere und der Milz.

Schweinedünndarm wird in der Fleischhackmaschine fein zermahlen und sodann mit Wasser und 0·25%iger Sodalösung gewaschen, bis keine säurefällbaren Substanzen mehr entfernt werden können. Nun wird die Masse bei Gegenwart von Toluol mehrere Tage lang einer intensiven tryptischen Verdauung unterworfen. Die Verdauungsrückstände werden mit Wasser und Alkohol gewaschen und in einem *Soxhlet*-Apparat mehrere Tage mit Äther extrahiert. Nach Wiederholung der Behandlung mit Trypsinalkali, Wasser, Alkohol und Äther hinterbleibt eine leichte, graue, faserige Masse. Dieses Material wird zunächst mit kochendem Wasser eine halbe Stunde lang behandelt, wobei es schnell seine Struktur verliert und, während ein Teil als Glutin in Lösung geht, in ein körniges lockeres Produkt verwandelt wird. Diese Behandlung wird so lange fortgesetzt, bis sich kein Glutin mehr löst, der endgültige Rückstand gegen Wasser dialysiert und mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

---

1) *E. Fischer, P. A. Levene* und *R. H. Aders*: Über die Hydrolyse des Leimes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**. 70 (1902).

2) *E. Fischer* und *E. Abderhalden*: Notizen über die Hydrolyse von Proteinstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**. 540 (1904).

3) *E. Hart*: Über die quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte von Eiweißkörpern. Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**. 347 (1901).

4) *E. Fischer*: Über das Fibroin und den Leim der Seide. l. c.

5) *E. Fischer* und *R. Bochner*: Bildung von Prolin bei der Hydrolyse von Gelatine mit Baryt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**. 118 (1910).

6) *A. Kossel* und *F. Weiss*: Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe. III. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **68**. 165 (1910).

7) *E. Abderhalden* und *R. Kautsch*: Nachweis des l-Prolins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **78**. 96 (1912).

8) *Tebb*: Journ. of Physiol. **27**. 463 (1892).

9) *Siegfried*: Habilitationsschrift. Leipzig 1892; Sitzungsber. d. sächs. Ges. d. Wiss. 1892; Journ. of Physiol. **28**. 319 (1893); *Halliburton*: Ten lectures on biochemistry of muscle and nerve. S. 54. London 1904.

III. Das Elastin.

Das Elastin ist die Grundsubstanz des elastischen Gewebes, besonders des zu einem derben Strang entwickelten Ligamentum nuchae. Es findet sich auch in den Wänden der Gefäße, besonders der Aorta und in Form von Einzelfibrillen im gewöhnlichen Bindegewebe eingelagert. *Horbaczewski*[1]) unterwarf zur Reingewinnung des Elastins das Nackenband folgenden Prozeduren:

Zuerst wird dasselbe in kleine Stücke geschnitten, drei bis vier Tage mit Wasser ausgekocht, dann mit 1%iger Kalilauge dirigiert und abermals mit Wasser ausgekocht, und dann mit 1%iger Essigsäure behandelt, mit Wasser ausgekocht, mit 5%iger Salzsäure 24 Stunden lang digeriert, mit Wasser gewaschen und schließlich mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahiert. Diese letzte Extraktion dauert, wenn sie vollkommen sein soll, zwei Wochen lang, selbst wenn man das Material vorher pulverisiert hat.

Nach *Richards* und *Gies*[2]) verfährt man zur Darstellung des Elastins aus dem Ligamentum nuchae folgendermaßen:

Das Nackenband wird in Streifen geschnitten, diese in der Fleischhackmaschine möglichst fein zerkleinert und die Masse in Gegenwart von Toluol 24 bis 48 Stunden gut mit Wasser gewaschen. Das so gereinigte Gewebe führt man nun in große verschlossene Flaschen über und unterwirft es 48 bis 72 Stunden lang der Extraktion mit einem großen Überschuß von kaltem halbgesättigten Kalkwasser (unter Toluolzusatz). Diese Extraktion wird mehrfach wiederholt und schließlich das Alkali durch sorgfältiges Waschen mit Wasser entfernt. Die Substanz wird dann mit wiederholt erneutem, kochendem Wasser behandelt, bis nur noch Spuren gelösten Eiweißes (Elastose) im Waschwasser auftreten. Nun wird zunächst wenige Stunden mit kochender 10%iger Essigsäure, sodann gleich lange Zeit mit 5%iger Salzsäure bei Zimmertemperatur extrahiert. Diese Extraktion wird alternierend wiederholt und der Rückstand durch Wasser und nachherige Dialyse säurefrei gewaschen. Schließlich wird das Produkt mit kochendem Alkohol und Äther ausgezogen und getrocknet. So gewonnene Elastinpartikel können leicht in einem Mörser zu einem cremefarbigen Pulver zerrieben werden.

Zur Darstellung des Elastins aus Arterien bedient man sich am besten der Aorta des Ochsen. Dieselbe wird fein zerkleinert,

---

[1]) *J. Horbaczewski*: Über das Verhalten des Elastins bei der Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **6**. 330 (1882).

[2]) *Richards* und *Gies*: Chemical studies of elastin, mucoid and other proteids in elastic tissue with some notes on ligament extractives. Amer. Journ. of Physiol. **7**. 93 (1902).



zuerst mit kaltem Wasser und dann mehrere Stunden mit häufig erneuertem kochenden Wasser behandelt. Die Rückstände werden sodann ein oder zwei Tage lang unter Toluolzusatz mit 0·25%iger Sodalösung digeriert, mit schwach angesäuertem Wasser gewaschen und 48 Stunden lang der Einwirkung einer straken Pepsinsalzsäurelösung ausgesetzt, welche bei Beginn des zweiten Tages erneuert wird. Hierauf wird der Rückstand mit ganz schwach alkalischem Wasser (Soda) gewaschen und nach sorgfältigem Auswaschen sechs Stunden lang mit oft erneuertem Wasser (am Rückflußkühler) gekocht. Nach dem Filtrieren und Waschen mit Wasser wird die so erhaltene Substanz bei 100° getrocknet, in kleine Stücke gebrochen und der beschriebene Prozeß wiederholt. Bei diesem Prozeß werden Kollagen, Muskelelemente und andere nicht elastinartige Substanzen entfernt. Aber außer dem Elastin befindet sich in der Aorta noch eine andere Proteinsubstanz, welche dem Elastin in ihrem Widerstand gegen obigen Reinigungsprozeß gleicht, und welche sehr schwer zu entfernen ist. Zu ihrer Beseitigung bedient man sich folgender Methode: Das trockene Material wird fein gepulvert und das Pulver so lange mit großen Mengen häufig erneuerten kochenden Wassers behandelt, als noch organische Substanz in Lösung geht. Die ungelöste Masse wird dann 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit 5%iger Salzsäure behandelt, durch Wasser und darauf folgende Dialyse von der Säure befreit und mit kochendem Alkohol entwässert. Schließlich wird das Produkt drei Tage lang mit täglich gewechseltem Äther extrahiert, um Fettsusbtanzen zu entfernen. Das trockene Elastin ist ein braungelbes Pulver (*Schwarz*[1]).

Vergleiche die Resultate der Totalhydrolyse des Elastins bei ***Abderhalden*** und ***Schittenhelm***[2]), ***H. Schwarz***[3]), ***Kossel*** und ***Kutscher***[4]) und ***Mörner***[5]). Über partielle Hydrolysen berichteten

---

[1]) *H. Schwarz*: Untersuchungen über die chemischen Beschaffenheit der elastischen Substanz der Aorta. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **18.** 487 bis 507 (1894). Vgl. auch *Bergh*: Untersuchungen über die basischen Spaltungsprodukt des Elastins beim Kochen mit Salszsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **25.** 337 (1898).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*: Die Abbauprodukte des Elastins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **41.** 293 (1904).

[3]) *H. Schwarz*: l. c.

[4]) *A. Kossel* und *F. Kutscher*: Über die Bildung von Arginin aus Elastin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **25.** 551 (1898).

[5]) *C. Th. Mörner*: Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **18.** 61 bis 106 (1894); vgl. auch über Kollagen.

E. Fischer[1]) und *E. Abderhalden*[2]). Analysen von Elastin verschiedenen Ursprungs hat *Ameseder*[3]) ausgeführt.

IV. Die „Albumoide“.

a) In der Linse des Auges fand *Mörner*[4]) ein „Albumoid“ in einer Menge von 17% der frischen Linse. Dargestellt wird es in folgender Weise: Durch fleißiges Umschütteln der in einer Glasflasche enthaltenen Linsen mit ein viertel gesättigter Kochsalzlösung werden die Linsenfasern Schicht für Schicht in der Flüssigkeit aufgeschlemmt. Durch Filtrieren wird das lösliche Eiweiß zum größten Teil entfernt, worauf die auf dem Filter gesammelte Linsenmasse in einer reichlichen Menge Kochsalz aufgeschlemmt wird. Nach Verlauf eines Tages wird die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und das Aufschlemmen so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit kein Eiweiß mehr gelöst enthält. Das Kochsalz wird nun aus der Substanz durch gründliches Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und die Substanz selbst auf einem Filter gesammelt. Sie kann ohne vorherige Alkohol- und Ätherbehandlung getrocknet werden.

b) Zwei Albumoide hat *Mörner* (l. c.) in den Grundsubstanzen der Linsenkapsel und der *Descemet*schen Haut nachgewiesen (tierische Membranine) und in folgender Weise dargestellt: Das rein präparierte Material wird mit 0·1%iger Kalilauge, welche in einem Zwischenraum von ein bis zwei Tagen erneuert werden muß, extrahiert, bis die Extraktionsflüssigkeit keine Eiweißreaktion mehr gibt und sodann das Alkali durch Auslaugen mit einer großen Menge destillierten Wassers zuerst bei Zimmertemperatur, dann bei 30 bis 40° entfernt. Die Membran behält bei dieser Behandlung vollständig ihr ursprüngliches Aussehen bei; sie wird mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet[5]).

---

[1]) *E. Fischer* und *E. Abderhalden*: Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteinen. Sitzungsber. d. kgl. preuß. Akad. der Wiss. **1907**. 574.

[2]) *E. Abderhalden*: Partielle Hydrolyse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **62**. 315.

[3]) *F. Ameseder*: Chemische Untersuchungen an verkalkten Aorten. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **70**. 451 (1911); II. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **85**. 324 (1913).

[4]) *C. Th. Mörner*: Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **18**. 61 bis 106 (1894); vgl. auch über Kollagen.

[5]) Vgl. *A. Jess*: Beiträge zur Kenntnis der Chemie der normalen und pathologisch veränderten Linse des Auges. Zeitschr. f. Biol. **61**. 93 (1913).

c) Im Balkennetz des älteren Knorpels wies *Mörner*[1]) ein Albumoid nach, welches durch Tropäolin gefärbt wird. Man stellt es aus dem Trachealknorpel dar, indem man denselben mit 0·2 bis 0·5%iger Kalilauge extrahiert, mit Wasser auswäscht und den Rückstand mit Wasser unter Druck zerkocht (bei 110 bis 120°). Zusammen mit den Knorpelzellen hinterbleibt dabei das Albumoid als schwammige Masse.

d) Ein Chondroalbumoid läßt sich (nach *Mörner*, l. c.) auch folgendermaßen darstellen: Man benützt dazu das Septum nasale von Schweinen oder Ochsen. Die Knorpel werden von den anhaftenden Geweben befreit, in der Fleischmaschine zerkleinert und die Masse mehrmals zur Entfernung des löslichen Eiweiß mit 0·1 bis 0·2%iger Salzsäure gewaschen. Danach wird die Salzsäure weggewaschen und die übrigen anhaftenden Substanzen, wie Chondromukoid, Nukleoprotein usw., durch anhaltende Extraktion mit 0·05 bis 0·1%iger Kalilauge in Gegenwart von Toluol entfernt, bis keine säurefällbare Substanz mehr nachgewiesen werden kann. Sodann beseitigt man das Alkali durch Waschen mit Wasser in Gegenwart von Toluol, worauf der Rückstand der Behandlung mit kochendem Wasser und dem weiter unten beschriebenen Prozeß zur Darstellung des Osseoalbumoides unterworfen wird (*Hawk* und *Gies*, loc. cit.).

e) Zur Darstellung eines „Osseoalbumoides" verfährt man auch in folgender Weise: Man stellt sich Ossein dar (wie gelegentlich der Kollagengewinnung beschrieben), wobei man die Osseinspäne in 0·2%iger, häufig erneuerter Salzsäure aufbewahrt. Nachdem das Ossein, wie bereits angegeben, mukoidfrei gewaschen und mit häufig erneuerter 0·2%iger Salzsäure bis zur Entfernung der Mineralbestandteile (Phosphate) behandelt ist, wird die Salzsäure durch Waschen mit Wasser und durch Dialyse entfernt. Das vollkommen säurefreie Ossein wird sodann mit kochendem Wasser behandelt, bis das Kollagen größtenteils in Glutin übergeführt ist und nur ein geringer Anteil unlöslicher Substanz hinterbleibt. Das Wasser wird bei diesem Prozeß häufig erneuert und das Kochen mit Wasser so lange fortgesetzt, bis die Lösung mit Pikrinsäure oder Quecksilberjodidjodkali nur noch schwache Trübungen gibt. Die schließlich hinterbleibende flockige gelbweiße Masse wird nun zuerst mit 0·2%iger Salzsäure, dann mit Wasser, dann mit 0·5%iger Soda, wieder mit Wasser, schließlich mit Alkohol und Alkoholäther gewaschen. Endlich wird sie noch einmal im *Soxhlet* mit Äther extrahiert und getrocknet. Das Osseoalbumoid stellt ein

---

[1]) *C. Th. Mörner*: *Maly*s Jahresber. **18.**; Skand. Arch. f. Physiol. I. 234 (1889).

leichtes, nicht hygroskopisches, gelbweißes Pulver dar (*Hawk* und *Gies*, l. c.).

f) Ichthylepidin nennt *Mörner*[1]) ein neben dem Kollagen in den Schuppen vieler Fische vorkommendes Albumoid. Die Darstellung desselben gelingt in folgender Weise: Nachdem die mit dem Messer losgemachten Schuppen von groben Verunreinigungen durch Aufschlemmen mit Wasser und durch Auslesen mit einer Pinzette von Beimengungen befreit worden sind, werden sie bei niederer Temperatur sukzessive mit 0·5%iger Salzsäure, 0·05%iger Kalilauge, 0·01%iger Essigsäure und destilliertem Wasser ausgelaugt — alles in großen Quantitäten — und jede der genannten Flüssigkeiten mehrere Tage hindurch unter häufigem Wechsel angewandt. Die auf diese Weise entkalkte Schuppenmasse wird während einiger Tage mit 0·1%iger, täglich gewechselter Salzsäure und schließlich mit Chloroformwasser digeriert, bis die Flüssigkeit bei der Färbung mit Lackmus keine Säurereaktion mehr anzeigt. Der säurefreie Rückstand wird nun mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet. *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*[2]) hydrolysierten das Ichthylepidin.

V. Das Koilin.

Als „Koilin" wird nach *K. B. Hofmann* und *F. Pregl*[3]) die Grundsubstanz der hornigen Auskleidung des Vogelmagens bezeichnet, welche bereits *Molin*[3]) als „erstarrtes Sekret eigener Drüsen" angesprochen hatte. *Hedenius*[3]) stellte die Substanz durch Erschöpfen der Hornschichte mit sehr verdünntem Ammoniak, essigsäurehaltigem Wasser, destilliertem Wasser, Alkohol und Äther dar. *Hofmann* und *Pregl* geben folgende Methode an: Die mechanisch gesäuberten, getrockneten und gepulverten Magenhäute werden mit 1%iger Natronlauge mazeriert, mit verdünnter Essigsäure und Wasser ausgewaschen, an der Luft getrocknet und mit Alkohol und Äther extrahiert. Das Koilin ist in siedendem Wasser unlöslich, wenig löslich in 30 bis 40%iger, leicht löslich in

---

[1]) *C. Th. Mörner*: Die organische Grundsubstanz der Fischschuppen vom chemischen Gesichtspunkt aus betrachtet. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **24.** 125 (1898); vgl. auch *E. H. Green* und *R. W. Tower*: Ichthylepidin in den Schuppen amerikanischer Fische. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **35.** 196 (1907).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Proteine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **52.** 368 (1907).

[3]) *Hedenius*: Skand. Arch. f. Physiol. **3.** 244 (1891); vgl. dazu *K. B. Hofmann* und *F. Pregl*: Über Koilin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **52.** 448 (1907). Ferner *Molin*: Denkschr. d. Wiener Akad. d. Wiss. **3.** (1852).

10%iger Natronlauge. Die Diaminosäuren des Koilins bestimmte *E. v. Knaffl-Lenz*[1]).

VI. Eihüllen-Proteinoide.

a) Keratoelastine: Die Eihüllen einiger monotremer Säugetiere sowie diejenigen verschiedener Reptilien und Fische: nehmen eine Zwischenstellung zwischen dem Elastin und den Keratinen ein. Die Reingewinnung dieser Substanzen ist einfach. Zum Zwecke neuerer Untersuchungen haben *Pregl* und *Buchtala*[2]) die Eihäute von Scyllium stellare, Pristiurus melanostomis und Scyllium canicula zuerst in 1%iger Salzsäure mehrere Tage quellen lassen, nach erfolgter Quellung abgespült, aufgeschlemmt und vom zurückgebliebenen gallertartigen Inhalt mechanisch unter dem Wasserstrahl befreit. Nachdem die Eihäute an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit Alkohol, sodann mit Äther und schließlich an der Luft völlig getrocknet.

Pregl (l. c.) hydrolysierte die Eihäute von Scyllium stellare.

Die Zusammensetzung der Eihäute von Testudo graeca ist von *Abderhalden* und *Strauß*[3]) untersucht worden.

b) Das Ovokeratin, die Hornsubstanz der Schalenhaut der Vogeleier, wird wie folgt dargestellt (*Abderhalden*[4]), *Lindwall*[5]), *Strauß* l. c.): Die Eierschalen werden mechanisch zerkleinert und hierauf in Wasser mehrere Stunden mit einem großen Rührer in beständiger Bewegung gehalten. Hiebei bleiben die Schalenhäute zum großen Teil am Rührer hängen, während die Schalenstücke sich am Boden des Gefäßes absetzen. Die von den anhaftenden Schalenteilen so weit als möglich gereinigten Häute werden mit 5%iger Salzsäurelösung zwei Tage stehen gelassen, dann mit 5%iger Essigsäure auf dem Wasserbade gekocht und dann so lange mit Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat keine Säurereaktion mehr

---

[1]) *E. v. Knaffl-Lenz*: Über die Diaminosäuren des Koilins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **52**. 472 (1907).

[2]) *F. Pregl*: Über die Eihäute von Scyllium stellare Guenth. und ihre Abbauprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **56**. 1 bis 10 (1908); *H. Buchtala*: Elementaranalyse der Eihäute von Scyllium stellare, Pristiurus melanostomis und Scyllium canicula und Verteilung des Stickstoffes in denselben. Ibid. S. 11 bis 17.

[3]) *E. Abderhalden* und *E. Strauß*: Die Monaminosäuren des Keratins aus Eiern von Testudo graeca. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **48**. 525 (1906).

[4]) *E. Abderhalden* und *E. Ebstein*: Die Monaminosäuren der Schalenhaut des Hühnereies. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **48**. 530 (1906).

[5]) *V. Lindwall*: Beitrag zur Kenntnis des Keratins. Laekaref. foerh. 16. Upsala *Malys* Jahresber. **11**. 38 (1881).

gibt. Durch Waschen mit Alkohol und Äther erhält man die Substanz schließlich trocken. Die Blättchen lassen sich zu einem feinen gelblichen Pulver zerreiben.

VII. Das Neurokeratin

ist die von *Kühne* und *Ewald*[1]) entdeckte, von *Kühne* und *Chittenden*[2]) weiter untersuchte, in den markhaltigen Nerven und in den nervösen Zentralorganen vorkommende Substanz, welche in Alkohol und Äther, in Magen- und Pankreassaft und in verdünntem Ätzkali unlöslich ist. *Argiris*[3]) (vgl. auch *Steel* und *Gies*[4]) verfuhr zu seiner Darstellung aus Gehirn in folgender Weise: Das Gehirn (Schale) wird nach Beseitigung der Häute und des anhaftenden Blutes durch die Fleischmaschine zerkleinert, mit Azeton drei- bis viermal behandelt und durch ein feines Haarsieb gerieben. Der Brei wird durch wiederholtes Schütteln mit neuen Äthermengen erschöpft, mit 75%igem Alkohol bei 40° so oft behandelt, bis das Filtrat beim Eindampfen keinen nennenswerten Rückstand hinterläßt, und schließlich mit einer Mischung gleicher Teile Benzol und Alkohol am Rückflußkühler ausgekocht. Die abfiltrierten Massen werden in Wasser suspendiert, in flachen Schalen durch Erhitzen auf dem Dampfbad von Benzol befreit, darauf in großen Zylindergläsern mit Wasser und so viel Soda, daß der Gehalt etwa 0·5% beträgt, versetzt und nach Zufügen von Pankreatin zwei Wochen bei einer Temperatur von 39° gehalten. Die Verdauungsflüssigkeit wird mehrfach abgehebert und ersetzt. Das schließlich als Bodensatz verbleibende feine Pulver wird nach Beseitigung der alkalischen Reaktion durch vorsichtigen Zusatz von Salzsäure mit so viel Alkohol gemischt, daß der Prozentgehalt an Alkohol etwa 75% beträgt, und am Rückflußkühler gekocht. Nach der Alkaliextraktion wird die Substanz mit Benzolalkohol in gleicher Weise extrahiert und nun abermals die tryptische Verdauung eingeleitet. Verdauung und Extraktion werden so lange alternierend wiederholt, bis die Verdauungsflüssigkeit keine Myelinsubstanzen mehr enthält. Der feine Brei wird nun mit 0·1%iger Salzsäure behandelt, mit Wasser säurefrei gewaschen und schließlich mit Alkohol und Äther durchgespült. Das Neurokeratin wird

---

[1]) *Kühne* und *Ewald*: Verhandlungen des Naturw.-mediz. Vereines Heidelberg 1877. Neue Folge. I. S. 357.

[2]) *Kühne* und *Chittenden*: Zeitschr. f. Biol. **21**. 291 (1899); vgl. auch **26**. und *Neumeister*: Ibid. **31**.

[3]) *A. Argiris*: Zur Kenntnis des Neurokeratins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **54**. 86 (1907).

[4]) *Steel* and *Gies*: On the chemical nature of paranucleoproteid, a new product from brain. Amer. Journ. of Physiol. **20**. 378 (1907).



alsdann in der Reibschale fein zerrieben und durch ein engmaschiges Seidenfilter gesiebt. Es entsteht ein hellgelbes geruchloses Pulver. Elementaranalyse und Hydrolyse des Neurokeratins hat *Burt E. Nelson*[1]) ausgeführt.

VIII. Die echten Keratine

sind die Grundsubstanzen der verhornten epithelialen Gewebe, und zwar diejenigen der Kutisgebilde. Da sie alle von ihrer Unterlage leicht zu isolieren sind, beschränkt sich ihre Darstellung meistens auf eine eingehende Reinigung durch Extraktion mit Wasser, Alkohol und Äther. Zur Isolierung der Hornhaut (Kutikula) ist es jedoch nötig, die Haut einer lang andauernden Pepsin- und Trypsinverdauung zu unterwerfen; hiebei hinterbleibt die eigentliche Hornschicht, welche dann mit Wasser gründlich gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet wird.

Nach *Gies* stellt man reines Keratin aus weißem Ochsenhorn in folgender Weise dar: Man schabt mit einem scharfen Stahlskalpell von reinem frischen Horn möglichst dünne Späne ab und zerkleinert dieselben sodann so weit als möglich in einer Pulvermühle. Das Material wird 24 Stunden lang mit wechselnden Mengen Alkohol und Äther zur Entfernung des Fettes extrahiert und dann zur Aufweichung der Patikelchen einige Stunden mit Wasser von 40° C behandelt (kochendes Wasser ist zu vermeiden). Nun wird die Substanz einer längeren Einwirkung von Pepsinsalzsäure (0·2%ige Salzsäure) bei 38 bis 40° und hierauf nach sorgfältiger Entfernung der Säure einer Einwirkung von stark aktivem Trypsinalkali (0·25%iges Soda) unterworfen. Die beiden Verdauungsprozesse müssen über eine Woche hindurch in Gegenwart von Toluol und mit mehrfach gewechselter Verdauungsflüssigkeit vorgenommen werden. Der Rückstand wird nun durch Waschen, dann durch Dialyse säurefrei gemacht und schließlich am Rückflußkühler mit einem Alkoholäthergemisch extrahiert. Nach Auswaschen mit warmem Äther wird das Produkt im Exsikkator getrocknet. *Unna* und *Golodetz*[2]), [3]) haben aus menschlicher Hornschicht und Ochsenhorn analytisch verschiedene Keratine durch Einwirkung rauchender Salpetersäure oder eines Gemisches von konzentrierter Schwefelsäure mit (33%) Wasserstoffsuperoxyd in der Kälte dargestellt: Ein Anteil bleibt ungelöst, aus der (albumosen-

---

[1]) *Burt E. Nelson*: Über die Zusammensetzung von Neurokeratin. Journ. Amer. Chem. Soc. **38**. 2558 (1916).

[2]) *P. G. Unna* und *L. Golsdetz*: Über Hornsubstanz. Monatsh. f. prakt. Dermatologie. **44**. 1 (1907); **47**. 62 (1908); *P. G. Unna*: Medizin. Klinik **1908**. 33.

[3]) Vgl. auch *E. Strauss*: Chemie der Hornsubstanzen. Dermatol. Wochenschrift. **70**. 337 (1920).

haltigen) Lösung fällt Wasserzusatz einen in verdünntem Ammoniak unlöslichen Anteil, aus der verbleibenden Lösung fällt Säure ein weiteres „Keratin".

Über die Resultate der hydrolytischen Spaltung liegen für verschiedene Keratine Angaben vor[1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12].

---

[1]) *E. Fischer* und *Th. Dörpinghaus*: Hydrolyse des Hornes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **36**. 462 (1902).

[2]) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*: Hydrolyse des Keratins aus Horn und Wolle. Ibid. **52**. 348 (1907).

[3]) *E. Abderhalden* und *E. R. Le Count*: Die Monoaminsäuren des Keratins aus Gänsefedern. Ibid. **46**. 40 (1905).

[4]) *E. Abderhalden* und *H. G. Wells*: Die Monoaminsäuren des Keratins aus Pferdehaaren. Ibid. **46**. 31 (1905).

[5]) *E. Abderhalden* und *D. Fuchs*: Der Gehalt verschiedener Keratinarten an Glutaminsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **57**. 339 (1908).

[6]) *H. Buchtala*: Über das Mengenverhältnis des Zystins in verschiedenen Hornsubstanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**. 474 (1907).

[7]) *H. Buchtala*: Das Kesatin der Elephantenepidermis. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **78**. 55 (1912).

[8]) *H. Buchtala*: Das Schildpatt von Chelone imbricata. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **74**. 212 (1911).

[9]) *H. Buchtala*: Das Keratin der Schuppen von Manis japonica. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **85**. 241 (1913).

[10]) *H. Buchtala*: Das Keratin von Schlangenhäuten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **85**. 335 (1913).

[11]) *H. Buchtala*: Das Keratin der weißen Menschenhaare. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **85**. 246 (1913).

[12]) *E. Abderhalden* und *Landau:* Monoaminsäuren der Barten des Nordwales. Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**. 455 (1911).

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden

Unter Mitarbeit von 500 bedeutenden Fachmännern herausgegeben von
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Emil Abderhalden
Direktor des Physiologischen Institutes der Universität Halle a. d. Saale

Abt. I, Chemische Methoden, Teil 8, Heft 4

Eiweißstoffe: Einfache Eiweißkörper

Proteine

Hermann Steudel-Charlottenburg: **Histone und Protamine.** — Julius Pohl-Breslau: **Das Arbeiten mit Organeiweiß.** — Hans Jessen-Hansen-Kopenhagen: **Darstellung und Untersuchung eines wohldefinierten Eiweißstoffes.** — Eduard Strauss-Frankfurt a. Main: **Umwandlungsprodukte der Proteine.** — Peter Rona-Berlin und Eduard Strauss-Frankfurt a. Main: **Methoden zur Enteiweißung von eiweißhaltigen Flüssigkeiten.** — Franz Samuely † und Eduard Strauss-Frankfurt a. Main: **Tierische Pigmente und Farbstoffe**

Titel, Inhalt, Sachregister zu Abt. I, Teil 8

Berlin N 24
Friedrichstraße 105 B

Urban & Schwarzenberg
1922

Wien I
Mahlerstraße 4

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Bisher liegen vor:

Lfg. 1 (Abt. I, Teil 9): **Schmidt** und **Grafe,** Alkaloide . . . . M 135.–
Lfg. 2 (Abt. III, A.): **v. Sanden,** Praktische Mathematik. — **Eichwald,** Mathematische Behandlung der chemischen Kinetik . . . . M 30.–
Lfg. 3 (Abt. V, Teil 6): **Koeppe,** Die biophysikalischen Untersuchungsmethoden der normalen und pathologischen Histologie des lebenden Auges . . . . M 36.–
Lfg. 4 (Abt. VI, A.): **Wirth,** Spezielle psychophysische Maßmethoden . . . . M 72.–
Lfg. 5 (Abt. XIII, Teil 1): **Schürmann,** Methoden der Immunisierung. Antisera. Technik der Gewinnung, Auswertung und Anwendung . . . . M 42.–
Lfg. 6 (Abt. I, Teil 1): **Krämer** und **Schrader,** Darstellung der wichtigsten anorganischen und organischen Reagentien . . . . M 36.–
Lfg. 7 (Abt. III, B): **Bachmann,** Methoden zur Erforschung der feineren Struktur von Gelen und Gallerten. — **Liesegang,** Spezielle Methoden der Diffusion in Gallerten . . . M 30.–
Lfg. 8 (Abt. VI, A.): **Kirschmann,** Grundzüge der psychologischen Maßmethoden . . M 30.–
Lfg. 9 (Abt. I, Teil 4): **Spinner,** Kohlenwasserstoffe. Allgem. Methoden zu ihrem Nachweis. Die wichtigsten Methoden ihrer Darstellung. Qualitativer und quantitativer Nachweis der einzelnen biologisch wichtigen Kohlenwasserstoffe. Ihre Isolierung . . . . M 13.50
Lfg. 10 (Abt. IV, Teil 10): **Müller,** Methodik der biologischen Gasanalyse. — **Krogh,** Mikrogasanalyse. — **Straub,** Technik der Blutgasanalyse nach Barcroft. — **Müller,** Quantitative Bestimmung des Gasstoffwechsels mitteis des Zuntz-Geppertschen Apparates . M 60.
Lfg. 11 (Abt. I, Teil 4): **Eichwald** und **Weil,** Alkohole, Ketone, Aldehyde, Oxyketone, Oxyaldehyde, Phenol- und Methoxylgruppe . . . . M 72.–
Lfg. 12 (Abt. V, Teil 7): **Budde,** Mathematische Theorie der Gehörsempfindung . . . M 48.–
Lfg. 13 (Abt. XI, Teil 2): **Grafe,** Die physikalisch-chemische Analyse der Pflanzenzelle. Permeabilitätsbestimmung bei Pflanzenzellen. Anwendung von Adsorption und Kapillarität zur biochemischen Analyse. Messung der Gas- und Wasserbewegungsvorgänge im Pflanzenorganismus . . . . M 42.–
Lfg. 14 (Abt. I, Teil 8): **Steudel, Thannhauser** und **Winterstein,** Nukleoproteide, Nukleinsäuren und ihre Abbaustufen . . . . M ·2.–
Lfg. 15 (Abt. I, Teil 3): **Biehringer,** Die wichtigsten stöchiometrischen Berechnungen. – **Emich,** Methoden der Mikrochemie . . . . M 81.–
Lfg. 16 (Abt. I, Teil 3): **Lieb.** Die Mikroelementaranalyse mit Einschluß der Halogenbestimmung nach Fritz Pregl. — **Dubsky,** Halb-Mikroelementaranalyse nach J. V. Dubsky. — **Fodor,** Die Mikro- und Makrokjeldahl-Stickstoffbestimmung. — **Simonis,** Makroelementaranalyse mit Einschluß der Halogenbestimmung. — **Dennstedt,** Die vereinfachte Elementaranalyse. – **Oelsner,** Methodik der Gesamtstickstoffbestimmung in Gegenwart von Nitrat und Nitrit. M 45.–
Lfg. 17 (Abt. V, Teil 2): **Unna,** Chromolyse Sauerstofforte und Reduktionsorte . . . M 21.–
Lfg. 18 (Abt. V, Teil 3): **Spemann,** Mikrochirurgische Operationstechnik. — **Barfurth,** Erforschung der Regeneration bei Tieren. — **Przibram,** Studium des Einflusses der Wärme, des Lichtes, der Elektrizität, der Schwerkraft und Zentrifugalkraft auf die Entwicklung. — **Herbst,** Die chemischen und physikalischen Methoden auf dem Gebiete der Entwicklungsmechanik. – **Neumayer,** Technik der experimentellen Embryologie . . . . M 54.–
Lfg. 19 (Abt. XIII, Teil 2): **Pfeiffer,** Die Arbeitsmethoden bei Versuchen über Anaphylaxie. – **Dold,** Die Präzipitine und die Methoden der Präzipitation. — **Messerschmidt,** Die Agglutination (einschließlich der Paragglutine). Die Opsonine . . . . M 60.–
Lfg. 20 (Abt. I, Teil 10): **Fonrobert, Harries, Grafe** und **Brieger,** Kautschuk und Flechtenstoffe M 108.–
Lfg. 21 (Abt. V, Teil 2): **Vonwiller,** Intravitale Färbung von Protozoen. — **v. Möllendorf,** Vitale Färbungen der Tierzellen . . . . M 15.–
Lfg. 22 (Abt. VI, Teil C.): **Wobbermin,** Religion . . . . M 9.–
Lfg. 23 (Abt. V, Teil 1): **Dittler,** Allgemeine Registriertechnik. — **Broemser,** Anwendung mathematischer Methoden. — **Müller,** Injektionstechnik. — Technik der Transfusion und Infusion. — Allgemeine Methodik zur Untersuchung überlebender Organe . . M 54.–
Lfg. 24 (Abt. XIII, Teil 1): **Marxer,** Malleus. — **Aujeszky,** Tollwut. — **Zeller,** Rinderpest. – Abortus. — **Giese,** Lungenseuche. — Bradsot. — **v. Werdt,** Rauschbrand. — Tetanus M 48.–
Lfg. 25 (Abt. I, Teil 3): **Herzig,** Makrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. – **Lieb,** Mikrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. — **Wohack,** Maßanalytische Mikromethoxylbestimmung. — **Simonis,** Qualitative und quantitative Bestimmung der Azetylgruppen. — **Biehringer,** Maßanalyse . . . . M 36.–
Lfg. 26 (Abt. I, Teil 8): **Schulz,** Blutfarbstoffe. — **Küster,** Komponente des Blutfarbstoffes. – Porphyrine. — Abbau des Hämatins und der Porphyrine, Synthese der Spaltungsprodukte. Pyrrolderivate. — Gallenfarbstoffe und Abbauprodukte des Bilirubins . . . . M 42.–
Lfg. 27 (Abt. VI, Teil B.): **Klemm,** Wahrnehmungsanalyse . . . . M 27.–
Lfg. 28 (Abt. X): **Halbfass,** Seenforschung. — **Arldt,** Paläographie . . . . . . M 33.–
Lfg. 29 (Abt. IV, Teil 9): **Haselhoff,** Bestimmung der Zusammensetzung der Nahrungsmittel der Tiere. — **v. Gröer,** Ernährungssystem von v. Pirquet. — **Aron** und **Gralka,** Fütterungsversuche mit künstlich zusammengesetzten Nährstoffgemischen . . . . . M 48.–

Weitere erschienene Lieferungen siehe Seite 3 des Umschlages.

Histone und Protamine.

Von **H. Steudel**, Berlin.

I. Histone.

Prinzip der Darstellung der Histone.

Die zerkleinerten Organe werden mit stark verdünnter Salzsäure extrahiert und aus dem Filtrat wird durch Zusatz von Ammoniak oder Natronlauge (eventuell unter Zuhilfenahme von Alkohol) ein Niederschlag von Histon erzeugt.

1. Histon aus Vogelblutkörperchen.

a) Isolierung der Kerne von Blutkörperchen aus Gänse- und Schlangenblut nach *Plósz*[1]).

Das defibrinierte Blut wird mit der zehnfachen Menge einer Na Cl-Lösung von 3% zur Senkung der Blutkörperchen hingestellt; der durch Abgießen der Flüssigkeit erhaltene Brei der Blutkörperchen wird mit Äther und Wasser geschüttelt, wodurch die Kerne von den umhüllenden Zellteilen befreit werden und sich an der Berührungsfläche zwischen Äther und Wasser zusammenballen. Zur weiteren Reinigung von den Hüllen sowie von dem darin haftenden Blutfarbstoffe wird diese Prozedur mit neuen Äther- und Wassermengen einige Male wiederholt, hierauf die Masse mit verdünnter Salzsäure, heißem Alkohol und Äther gewaschen, wodurch die Kerne von den daran haftenden Zellresten vollständig befreit werden.

Oder: Die Blutkörperchen werden nach dem Behandeln mit Wasser und Äther in künstliche Verdauungsflüssigkeit gebracht und unter öfterem Erneuern 40 bis 60 Stunden der Wirkung derselben ausgesetzt, dann mit verdünnter Salzsäure, Alkohol und Äther gewaschen.

Isolierung der Kerne von Blutkörperchen aus Hühnerblut nach *Plenge*[2]).

Das unter Umrühren fibrinfrei gewonnene Blut wird möglichst frisch mit 0·9%iger Na Cl-Lösung verdünnt und in einer 4 *l* fassenden

[1]) *Plósz*: *Hoppe-Seylers* med.-chem. Untersuchungen. 461.

[2]) *Ackermann*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 300.

Zentrifuge ausgeschleudert. Die abgesetzten Blutkörperchen werden noch einmal mit 0·9%iger Na Cl-Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert.

Die gewaschenen Blutkörperchen werden je nach der Menge in 1 oder 2 Scheidetrichtern von je 2 *l* Inhalt eingebracht und in jedem mit 1500 cm^3 Wasser von 40° geschüttelt. Nach einiger Zeit werden zu je 1500 cm^3 Wasser 500 cm^3 Na Cl-Lösung von 3·6% hinzugefügt. Dann wird zentrifugiert. Die abgesetzten Kernmassen werden von neuem in einem Scheidetrichter in 1500 cm^3 Wasser von 40° unter Umschütteln suspendiert. Nach Hinzufügen von 500 cm^3 Na Cl-Lösung von 3·6% wird wiederum zentrifugiert.

Dies Vorgehen wird so oft wiederholt, bis die Masse ein farblos glasiges Aussehen ohne rote Streifen hat und an die Kochsalzlösung keinen Blutfarbstoff mehr abgibt. Dann wird die Kernmasse wiederum in Wasser zum Aufquellen gebracht und mit dem doppelten Volumen Alkohol zur Schrumpfung gebracht, zentrifugiert, in 96%igen Alkohol gebracht, abgesaugt, noch einmal mit 96%igem Alkohol verrieben und abgesaugt, dann in absolutem Alkohol und darauf in Äther getrocknet und abgesaugt.

Die ganzen Manipulationen dürfen bis zum Einbringen in Alkohol nicht mehr als 3 Tage in Anspruch nehmen. Es empfiehlt sich, die Kernmassen nachts über nicht mit Wasser allein, sondern nach Zufügung der Na Cl-Lösung an einem kühlen Platze aufzubewahren.

b) Darstellung von Histon aus den Kernen von Vogelblutkörperchen nach *Kossel*[1]).

Die auf die eine oder andere Weise gewonnenen Kerne werden mit 0·8%iger Salzsäure extrahiert, filtriert und aus dem Filtrat das Histon durch Eintragen von Steinsalz ausgefällt. Der reichlich entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit salzhaltiger Säure ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und nun der Dialyse unterworfen. In dem Maße, wie das Salz durch Diffusion entfernt wird, geht die Substanz im Innern des Dialysators in Lösung. Aus der neutralen salzfreien Lösung wird das Histon durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak ausgefällt, abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet.

2. Histon aus der Thymusdrüse.

a) Darstellung nach *Kossel* und *Kutscher*[2]).

Das feinzerhackte Thymusgewebe wird mit etwa der doppelten Menge Wasser bei gewöhnlicher Temperatur ausgezogen und das wässerige Extrakt mit Salzsäure versetzt, bis der Gehalt an Salz-

[1]) *Kossel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**. 511.
[2]) *Kossel* und *Kutscher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 188.

säure 0·8% beträgt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernt und das klare Filtrat mit Ammoniak gefällt. Das ausgefällte Histon wird mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, in Alkohol gebracht und sodann mit Alkohol, zuletzt mit Äther völlig extrahiert.

b) Darstellung von Parahiston aus der Thymusdrüse nach *Fleroff*[1]).

Nimmt man statt der frischen Thymusdrüse das zerkleinerte, mit Alkohol und Äther erschöpfte Gewebe und extrahiert dieses 48 Stunden lang mit 2%iger Schwefelsäure, auf je 100 *g* 1000 cm^3 H_2SO_4, so erhält man in dem Auszuge durch die dreifache Menge 96%igen Alkohols einen Niederschlag, der in heißem Wasser gelöst und mit Natriumpikrat ausgefällt wird. Das Pikrat wird mit Äther und 2%iger Schwefelsäure von der Pikrinsäure befreit und die Lösung mit Alkohol gefällt. Das durch wiederholtes Umfällen gereinigte Sulfat gibt, in heißem Wasser gelöst, mit überschüssigem Ammoniak einen Niederschlag (Histon), von dem abgetrennt wird. Aus dem Filtrat erhält man durch Fällung mit Alkohol das Parahiston, das nach einmaligem Umfällen und Filtrieren mit Alkohol und Äther getrocknet wird.

In gleicher Weise wie aus Vogelblutkörperchen läßt sich nach *Kossel* und *Kutscher*[2]) aus den reifen Spermatozoen von Gadus (Kabliau) ein Histon gewinnen — Gadushiston —, aus dem reifen Sperma von Lota vulgaris nach *Ehrström*[3]) ebenso das Lotahiston. Das unreife Sperma scheint häufig ein Histon zu enthalten (Scombron[4]), Lachsalbuminose[5]). Das reife Sperma von Arbacia vulgaris (Seeigel) liefert ein Histon, das Arbazin[6]).

3. Darstellung des Globins.

Zu den Histonen gerechnet wird ferner von einigen Autoren unrichtigerweise das Globin, der Haupteiweißkörper des Hämoglobins (*Fr. N. Schulz*[7]). Das Globin gibt die Reaktionen der Histone nicht[8]) und unterscheidet sich von ihnen auch wesentlich durch seinen Hexonbasengehalt (siehe S. 581).

---

[1]) *Fleroff*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 307.
[2]) *Kossel* und *Kutscher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 188.
[3]) *Ehrström*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 351.
[4]) *Bang*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**. 463.
[5]) *Miescher*: Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **37**. 151.
[6]) *Mathews*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**. 399.
[7]) *Schulz*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 449.
[8]) *Kossel*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**. 314.

Setzt man zu einer Hämoglobinlösung eine sehr geringe Menge stark verdünnter Salzsäure, so entsteht eine flockige, braune Fällung, die sich im geringsten Überschuß von Säure sofort leicht löst. Die so erhaltene Lösung zeigt nicht mehr die schöne rote Farbe der ursprünglichen Hämoglobinlösung, sondern einen braunen Farbenton; jedoch wird dadurch nicht nur die Lösung in ihrer Farbe verändert, sondern es ist auch eine komplette Trennung zwischen Eiweißkörper und Farbstoff eingetreten. Setzt man nämlich zu einer solchen Lösung, die eben sauer reagiert, Alkohol (zirka 0·2 Vol.) und schüttelt nunmehr mit Äther aus, so tritt der ganze Farbstoff in den Äther über, während die untenstehende, wässerig-alkoholische, völlig klare Lösung den entfärbten Eiweißkörper enthält. Diese Spaltung und Trennung vollzieht sich mit ganz überraschender Leichtigkeit, wenn man einige Vorsichtsmaßregeln beobachtet. Zunächst muß die Hämoglobinlösung salzfrei oder doch sehr salzarm sein. Verwendet man eine salzreichere Lösung, so tritt, wenn man nicht außerordentlich vorsichtig verfährt oder mit verdünnten Lösungen arbeitet, auf Säurezusatz nicht eine vorübergehende, sondern eine bleibende, im Überschuß von Säure unlösliche Fällung auf. Diese bleibende Fällung erfolgt auch in salzfreien Lösungen, wenn man, nachdem der zuerst sich bildende Niederschlag durch einen sehr geringen Überschuß von Säure gelöst ist, nunmehr eine größere Menge von Säure hinzusetzt. — Ein stärkerer Salzgehalt wirkt auch beim Ausschütteln der durch vorsichtigen Säurezusatz erhaltenen Lösung mit Alkoholäther störend. Die Trennung des Farbstoffes vom Eiweißkörper vollzieht sich zwar auch hier glatt, aber der Eiweißkörper bleibt nicht in Lösung, sondern wird ausgefällt und nunmehr durch die Einwirkung des Alkohols leicht koaguliert.

In betreff des Ausschüttelns mit Äther ist zu bemerken, daß sich die Trennung des Äthers von dem wässerigen Alkohol leicht und sehr glatt vollzieht, wenn ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wasser, Alkohol und Äther besteht, welches man am besten in jedem Versuche ausprobiert. Man setzt zunächst zirka 0·2 Vol. 80%igen Alkohols zu der Hämoglobinlösung hinzu und versucht dann mit dem halben Volumen Äther auszuschütteln. Scheidet sich die Ätherschicht nicht sofort nach dem Schütteln glatt ab, so setzt man von neuem etwas Alkohol hinzu und versucht, ob sich nunmehr der Äther auch nach heftigem Schütteln sofort abscheidet. Ist dies nicht der Fall, so setzt man so lange vorsichtig Alkohol hinzu, bis eine rasche und glatte Abscheidung eintritt. Arbeitet man mit sehr konzentrierten Lösungen, so ist es zweckmäßig, wenn man kurze Zeit heftig geschüttelt hat, den Äther zu erneuern.

Man erhält so eine klare, mehr oder weniger braungelb gefärbte, wässerig-alkoholische, schwach saure Lösung. Aus dieser fällt

beim Neutralisieren mit Ammoniak ein schwach gelb gefärbter, grobflockiger Niederschlag aus, der sofort abgesaugt wird. Dann wird er in Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure gelöst und durch mehrtägiges Dialysieren die Essigsäure entfernt; man erhält so eine völlig neutrale, absolut klare, schwach gefärbte Globinlösung.

4. Eigenschaften der Histone.

Sämtliche Histone sind stark basische Eiweißkörper, die ihrem Bau nach zwischen den einfachen Eiweißkörpern, den Protaminen und den komplizierten Eiweißkörpern stehen. Sie sind relativ stickstoffreich, 17 bis 20% N, und liefern bei der Hydrolyse verhältnismäßig reichliche Mengen von Hexonbasen:

	Histon aus Thymus[1])	Gadushiston[2])	Lotahiston[3])	Globin[4])	
Histidin . .	1·21	2·34	2·85	10·96	siehe dazu S. 579
Arginin . .	14·36	15·52	12·00	5·42	
Lysin . . .	7·7	8·30	3·17	4·28	

Ihre Basizität ist der Grund, daß sie, ähnlich wie die Protamine, schon aus neutraler Lösung durch die Alkaloidreagentien (phosphorwolframsaures, phosphormolybdänsaures, pikrinsaures Natron, Ferrozyankalium) ausgefällt werden. Die meisten Histone sind fällbar durch Ammoniak, geben mit Salpetersäure einen Niederschlag, der in der Wärme verschwindet und beim Erkalten wieder erscheint, und gerinnen beim Erhitzen einer salzhaltigen, neutralen Lösung.

Mit den komplizierteren Eiweißstoffen geben sie in Wasser unlösliche Niederschläge. Durch Pepsinsalzsäure werden sie zerlegt unter Bildung eines als Histopepton bezeichneten albumoseartigen Produkts, das die basischen Eigenschaften der Histone ebenfalls besitzt (Fällung durch Natriumpikrat in neutraler Lösung).

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Histon sind die Blutkörperchenkerne von Vogelblut, die Thymusdrüse und die reifen Spermatozoen einiger Fischarten (z. B. Gadus, Lota).

---

[1]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 191 (1900); vgl. auch *Emil Abderhalden* und *Peter Rona*: Die Abbauprodukte des „Thymushistons"; ebenda. **41**. 278 (1904).

[2]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*: l. c. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 195 (1900).

[3]) *R. Ehrström*: Über ein neues Histon aus Fischsperma. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 351 (1901).

[4]) *E. Abderhalden*: Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 493 (1903).

II. Protamine.

1. Darstellung von Clupein aus Heringssperma[1]).

Die Spermatozoen werden aus den reifen Fischhoden isoliert und mit verdünnter Schwefelsäure extrahiert; aus dem Extrakt wird das Protaminsulfat mit Alkohol ausgefällt und dieses weiter gereinigt (Ausscheidung als Öl, Fällung als Pikrat und Wiedergewinnung des Sulfats.)

Die reifen Testikel werden zerhackt. Die zerhackte Masse wird mit Wasser anhaltend geschüttelt, durch ein Tuch geseiht und die milchige, kolierte Flüssigkeit mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt. Hiedurch bewirkt man, daß die im Wasser suspendierten morphotischen Elemente sich zusammenballen. Die Flüssigkeit wird filtriert, der Filterrückstand mehrmals mit Alkohol ausgekocht, sodann mit Äther extrahiert und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Je 100 *g* dieser Spermamasse werden mit 500 *cm*³ 1%iger Schwefelsäure eine viertel Stunde lang auf der Schüttelmaschine ausgeschüttelt, auf der Nutsche abgesaugt und diese Extraktion noch dreimal mit der gleichen Menge Schwefelsäure wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden mit der dreifachen Menge Alkohol gefällt, die Flüssigkeit nach 12 bis 24 Stunden dekantiert und der Niederschlag, welcher aus schwefelsaurem Protamin besteht, abgesaugt. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt beträgt etwa 20% der trockenen Spermamasse. Zur weiteren Reinigung löst man den Niederschlag in heißem Wasser und wiederholt die Alkoholfällung. Wenn man jetzt den Niederschlag in etwa 1·5 *l* heißen Wassers löst und im Scheidetrichter erkalten läßt, so scheidet sich ein kleiner Teil des Protaminsulfates als gelb gefärbtes Öl ab. Dieser am schwersten lösliche Teil des Sulfates wird abgetrennt, die über dem Öl stehende Flüssigkeit auf ein kleines Volumen eingedampft und im Scheidetrichter zur Ausscheidung der Hauptmenge des Öls stehen gelassen. Der nunmehr gewonnenen Fraktion des Protaminsulfates haftet hartnäckig etwas Nukleinsäure an. Um das Protamin hiervon zu befreien, wird es wieder in warmem Wasser gelöst, mit Natriumpikrat ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt, gut ausgewaschen und möglichst bald durch Ausschütteln mit Äther bei Gegenwart von Schwefelsäure von der Pikrinsäure wieder befreit. (Läßt man das Protaminpikrat längere Zeit stehen, so ist es schwer, die Pikrinsäure nachher völlig wieder zu entfernen und zum Schluß rein weiße Präparate zu bekommen.) Das nunmehr erhaltene Sulfat wird wieder mit Alkohol ausgefällt und die Alkoholfällung noch einmal wiederholt. Das Sulfat soll ein lockerer, weißer

[1]) *A. Kossel*: Über die basischen Stoffe des Zellkerns. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 178 (1896).

Niederschlag sein, fällt es klebrig aus, so muß das Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol wiederholt werden.

Nach dieser Methode können Salmin und Klupein in gleicher Weise gewonnen werden, bei der Darstellung von Sturin und Akzipenserin muß die Lösung des Sulfates wegen der größeren Löslichkeit dieser Salze weiter eingedampft werden. Die Lösung des Zyklopterinsulfates[1] .muß bis auf 2° abgekühlt werden, damit sich alles Protaminsulfat als Öl abscheidet.

2. Eigenschaften der Protamine.

Die Protamine sind stark basische, stickstoffreiche (25 bis 30%) Eiweißkörper, die bei mäßiger Hydrolyse Protone[2]) und bei vollständiger Spaltung in großer Menge Arginin liefern, daneben in weit geringerer Quantität Histidin, Lysin und einige wenige Monoaminosäuren, Prolin, Alanin Aminovaleriansäuren. Das Zyklopterin enthält auch Tyrosin. Die Protamine geben in neutraler Lösungmit den Alkaloidreagentien Niederschläge und bilden in ammoniakalischer Lösung mit den komplizierteren Eiweißkörpern usw. unlöslicheVerbindungen.

Sie sind optisch aktiv: Salminsulfat: $\alpha_D = -80{\cdot}8$
Klupeinsulfat: $\alpha_D = -85{\cdot}49$[3])
Skombrinsulfat: $\alpha_D = -71{\cdot}81$[4]).

Ausgangsmaterial: Die reifen Testikel von Lachs, Hering, Stör, Makrele usw.

3. Nitrierung eines Protamins.

Nitroklupein.

Durch Einwirkung von 1 *cm*³ rauchender Salpetersäure auf 2 *g* Klupeinsulfat in 4 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 und 2 *cm*³ rauchender Schwefelsäure (10% SO_3) unter Eiskühlung erhält man Nitroklupein — rein weißer Niederschlag, leicht löslich in verdünnter Natronlauge, geht beim Erwärmen mit verdünntem Ammoniak oder mit Natriumkarbonatlösung in Lösung; die letztgenannten Lösungen trüben sich beim Erkalten; gibt Binretreaktion.

Bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure bei Siedetemperatur gibt Nitroklupein Nitroarginin, $C_6H_{13}O_4N_5$, Kristalle, F. 227 bis 228°, rechtsdrehend, wenig löslich in kaltem, leicht in heißem Wasser, verdünnter Salzsäure, Salpetersäure und verdünnter Ammoniakflüssigkeit; unlöslich in siedender Essigsäure. Die wässerige Lösung reagiert neutral.

Aus d-Argininnitrat kann man den Körper ebenfalls bei der Nitrierung auf die oben beschriebene Weise erhalten.

[1]) *Morkowin*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 313.
[2]) *Goto*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**. 106; *Kossel* und *Pringle*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**. 311.
[3]) *Kurajeff*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 5218.
[4]) *Kossel* und *Kenneway*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**. 486.

Dieses Nitrearginin ist wahrscheinlich ein Derivat des unsymmetrischen Nitroguanidins [*Thiele*: *Liebigs* Annalen **270.** 1. (1892)] der Formel

$NO_2 . NH . C(NH) NH . CH_2 . CH_2 . CH_2 . CH NH_2 . CO OH.$

Im Klupein sind also freie reaktionsfähige Guanidingruppen vorhanden, die sich sowohl bezüglich der Säurebindung als auch bei der Nitrierung ebenso wie die Guanidingruppe des Arginins verhalten.

Um zu entscheiden[1]), ob der Formel

$$NO_2 . NH . C (NH) . NH . (CH_2)_3 CH_2 . NH_2 . CO OH$$

entsprechend am Ornithinrest des Nitroarginins eine freie Aminogruppe vorhanden ist, kann das von *van Slyke* angegebene Verfahren zur Bestimmung des freien Aminostickstoffes dienen. Die Aminogruppe des Guanidins und ebenso die des asymmetrischen Nitroguanidins wird unter den von *van Slyke* angegebenen Bedingungen nicht von salpetriger Säure angegriffen, während die Aminogruppe der Aminosäuren ihren N vollständig abgibt. Da nun das aus Nitroklupein gewonnene Nitroarginin bei dem Versuche so viel N entwickelt, wie der Zersetzung einer Aminogruppe in einem Molekül Nitroarginin entspricht, diese Aminogruppe aber nur die des Ornithinrestes sein kann, so ist der Ornithinrest des Arginins mit seiner Aminogruppe an das benachbarte Karboxyl gebunden und diese Verbindung wird bei der Hydrolyse des Klupeins oder Nitroklupeins gelöst. Für die Verbindung der Argininigruppen im Klupein ergibt sich also das folgende Schema:

$$... CO . NH . CH (C_3 H_6 . NH . C NH . NH_2) . CO . NH . CH (C_3 H_6 . NH . C NH . NH_2) CO . NH ...$$

Bei den anderen Protaminen, die komplizierter zusammengesetzt sind, liegen die Verhältnisse ähnlich.

Durch Einwirkung von Natronlauge[2]) (annähernd normal) wird die Nitroargininingruppe nach folgender Gleichung zersetzt:

$$\begin{array}{l} R . CO . NH . R_1 \\ \quad | \\ \quad C_3 H_6 \\ \quad | \\ \quad NH \\ \quad | \\ \quad C = NH \\ \quad | \\ \quad NH . NO_2 \end{array} + H_2 O = \begin{array}{l} R . CO . NH . R_1 \\ | \\ C_3 H_6 \\ | \\ NH_2 \end{array} + CO_2 + N_2 O + NH_3$$

Bei der Spaltung einer derartigen Reaktion unterworfener Eiweißkörper erhält man an Stelle von Arginin Ornithin.

[1]) *Kossel* und *Cameron*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **76.** 457; *Kossel* und *Weiß*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **78.** 402.

[2]) *Kossel* und *Weiß*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **84.** 1.



Das Arbeiten mit Organeiweiß.

Von **J. Pohl**, Breslau.

Das Blut hat, mit Ausnahme der respiratorischen, osmotischen und Alkalifunktion, nur sehr wenige selbständige chemische Aufgaben; so könnten sich, da die als Vorstufe der Antitoxinbildung angenommene Abstoßung toxophorer Gruppen zu keiner bisher nachweisbaren Änderung in der analytischen Zusammensetzung der Organe geführt hat, auch die wesentlichsten Phasen der Antigenleistung in ihm abspielen, wofür die umfassende Änderung seiner Zusammensetzung während des Immunisierungsprozesses (Leukozytose, Globulinvermehrung, Fibrinvermehrung) spricht.

Die überwiegende Anzahl aller anderen Funktionen geht in den Organen vor sich. Während nun seit Bestand einer experimentellen Physiologie die Funktionen selbst tausendfältig studiert worden sind, ist dem Substrat derselben weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Zu den elementaren Bestandteilen jeder Zelle gehören ihre Eiweißkörper.

Ansatz und Abbau, also Wachstum und Mästung einerseits, Hunger und Krankheit andererseits, kurz der Gesamtstoffwechsel, ob normal, ob abnorm, verlaufen unter ihrer Beteiligung und müssen sich zahlenmäßig an ihnen äußern.

Vergeblich sucht man für diese theoretisch konstruierten zellulären Vorgänge nach den entsprechenden analytischen Belegen.

Die Leichtigkeit, mit der die Eiweißkörper des Blutes, der Milch, der Sekrete zugänglich sind, ist der äußere Grund dafür gewesen, daß sich die Eiweißchemie und Eiweißbiologie vorwiegend mit ihnen als Ausgangsmaterial befaßt hat. So beschäftigt sich auch die moderne Immunochemie überwiegend mit dem Serum, während eventuelle Organveränderungen kaum in Betracht gezogen worden sind. Ursache hiefür ist das Unvertrautsein mit einer Methodik, die es gestattet, aus Organen dem Serum ähnliche, quantitative Bestimmungen zulassende Lösungen zu gewinnen. Nachdrücklichst auf eine solche hinzuweisen, das Verfahren zur Bestimmung qualitativer und quantitativer Änderungen des Eiweiß-

bestandes sowie seine Anwendungsfähigkeit zu beschreiben, ist Aufgabe nachfolgender Zusammenstellung.

Der Ausdruck Organeiweiß bringt den literarischen Kampf zwischen *Voit* und *Pflüger* über dieses Thema in Erinnerung. *Voit* definierte jenes als das in den Organen befindliche, im Stoffwechsel nicht direkt angreifbare, fest gebundene Eiweiß im Gegensatz zu dem in den Säften gelösten, nicht organisierten Vorrats- oder zirkulierenden Eiweiß; ursprünglich meinte er auch, daß sich die Zersetzungen an letzterem abspielen. *Pflüger*[1]) stürzte diese Lehre; er wies nach, daß die Oxydation zellulär von statten geht. Daß das Nahrungseiweiß erst nach vorangegangener Organisation oxydabel sei, scheint ihm sicher. Wo aber und wie der zelluläre Aufbau erfolgt, wie der Weg vom Organischen zum Organisierten geht, das ist bis heute dunkel geblieben. *Pflüger* schließt seinen der Widerlegung *Voits* gewidmeten Aufsatz mit folgendem Passus: „Wenn die Wissenschaft einmal so weit fortgeschritten sein wird, zu entscheiden, ob alle Moleküle, die in der Zelle oxydiert werden, vorher Bestandteile der organisierten Materie gewesen sein müssen, wird es sich vielleicht herausstellen, daß wir einen Streit um des Kaisers Bart führten. Da die lebendige organisierte Materie die Nährstoffmoleküle chemisch verarbeiten soll, so muß sie dieselben doch packen, d. h. in ihren Bestand in bestimmter Weise einfügen. Nun wird es von der Begriffsbestimmung abhängen, ob ein solches zur Bearbeitung gepacktes Nährstoffmolekül, weil in die Organisation eingefügt, als Bestandteil der organisierten Materie anerkannt werden soll oder nicht. Es gibt ja gewiß in der organisierten Zellsubstanz sogar verschiedene Arten organisierter Eiweißmoleküle.“

Die seitherige Erfahrung lehrt mich, daß in den ausgespülten Organen tatsächlich nur Eiweißkörper vorhanden sind, die gänzlich von denen des Blutserums verschieden sind. Es gibt somit ein Organeiweiß bezw. Organeiweißkörper.

Gegenüber weit ausgreifenden allgemeinen Ausführungen aber ist es notwendiger, die stofflichen Änderungen der einzelnen Organe unter wechselnden Bedingungen zahlenmäßig kennen zu lernen. Voraussetzung hiezu ist die Kenntnis der Zelleiweißkörper. Im Vergleich zu der Fülle von Tatsachen, die in dem letzten Dezennium über die Abbau- und Spaltungsprodukte der direkt zugänglichen Eiweißkörper erforscht worden sind, stehen wir auf diesem Gebiete trotz seiner außerordentlichen Wichtigkeit in den Anfängen.

[1]) *Pflüger*: Über einige Gesetze des Eiweißstoffwechsels. Arch. f. Physiol. **54**. 333 (1893).

I.

Die parenchymatösen Organe enthalten nach den landläufigen Anschauungen Gewebsglobuline, Nukleoproteine, Stromine (Stützsubstanzen). Die wichtigsten Angaben bezüglich der wasserlösenden, salzlöslichen koagulablen Eiweißkörper sind folgende: *Ploß*[1]) fand in der Leber 1. einen bei 45° koagulablen, in Essig und Salzsäure löslichen, ganz verdaulichen Eiweißkörper; 2. ein bei 70° koagulables Nukleoalbumin (heute definiert man die Nukleoalbumine als inkoagulable Eiweißkörper); 3. einen bei 75° koagulablen Körper. *Halliburton*[2]) deutete zuerst die Organeiweißkörper für Nukleoalbumine identisch mit Gewebsfibrinogen. Später beschrieb er in der Leber ein im Überschuß von Essigsäure leicht lösliches Hepatoglobin, ein bei 68 bis 70° ausfällbares Globulin, daneben ein Nukleoalbumin und etwas Albumin.

Bottazzi[3]) gewann 1895 aus der Milz ein Zytoglobulin α, koagulierbar bei 49°, ein Protein, koagulierbar bei 63 bis 96°, ein Zytoglobulin β, bei 74 bis 74° koagulierbar, und Zytoalbumine.

Die Muskeleiweißkörper, wie sie durch *v. Fürth*[4]) eine gründliche Revision erfahren haben, sowie die Schilddrüseneiweißkörper, die von *Oswald* genau beschrieben worden sind, mögen bei der nachfolgenden Zusammenstellung ausgeschlossen bleiben. Unsere Kenntnisse der eigentlichen Nukleoproteine basieren auf den Forschungen von *Kossel*, *Hammarsten*, *Halliburton*, *Gamgee*, *Wohlgemuth*, *Umber*, *Burian*, *Neumann*, *Mendel*, *Levene* u. a. m. und sind in anderen Teilen dieses Werkes beschrieben. Zur Darstellung derselben wurden meist die Filtrate koagulierter Organe benützt oder die gekochten Organfiltrate mit Pikrinsäureessigsäure und dann mit Alkohol gefällt. Daß hiedurch nur der kleinste Teil der tatsächlich vorhandenen Nukleoproteine in Untersuchung gezogen wurde, wird aus der folgenden Darstellung erhellen.

Die Gewinnung einer Organeiweißlösung, die ich wegen ihrer Beziehung zum Protoplasma und der Homologie zum Blutplasma als Organplasma bezeichne, hat ein vollständiges Freisein von Blutbestandteilen zur wesentlichen Voraussetzung. Am besten benützbar ist die Leber, Niere, Milz, Plazenta, Herz, kurz Organe mit leicht präparierbaren zuführenden Gefäßen; doch auch aus dem Gehirn, peripheren Nerven, nicht minder aus embryonalen Organen, ja selbst aus dem Kaltblüterorganismus lassen sich der-

[1]) *Ploß*: *Pflügers* Archiv. **7**. 371 (1873).

[2]) *W. D. Halliburton*: The proteids of kidney and liver cells. Journal of physiology. **13**. 808 (1880).

[3]) *Bottazzi*: Les substances albuminoides de la rate. Arch. ital. Biolog. 453 (1895).

[4]) *v. Fürth*: Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas. Arch. f. exper. Path. **36**. 231 (1895).

artige Eiweißauszüge gewinnen. Die Ausspülung, die bei der Leber von der Vena cava rückläufig erfolgt, wird mit einer kalziumfreien, aus reinstem Kochsalz dargestellten 0·8%igen Kochsalzlösung so lange durchgeführt, bis das Spülwasser aus den abführenden Gefäßen farblos abläuft.

Für qualitative Arbeiten genügt es, das völlig entblutete Organ sodann zu einem Brei zu zerkleinern, eventuell durch Siebe durchzupressen und den mit entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung nach Toluol- oder Benzolzusatz tüchtig durchgeschüttelten Organbrei 24 Stunden in der Kälte stehen zu lassen. Dann wird filtriert, die ersten Anteile sind gewöhnlich trüb, nach wiederholtem Zurückgießen des Filtrates erhält man aber schließlich völlig klare, in ihrem Aussehen an ein Blutserum erinnernde Lösungen. Selbst aus glykogenhaltigen Lebern wird schließlich ein hellgelbes Plasma gewonnen.

Für quantitative Arbeiten ist es besser, den Organbrei nach Durchpressen durch Siebe auf Glasplatten im Ventilator bei Zimmertemperatur rasch zu trocknen. Die getrockneten Pulver[1]) verwahrt man über konzentrierter Schwefelsäure, wodurch sie wochen- und monatelang unverändert bleiben. Die weitere Verarbeitung siehe im Folgenden S. 589. Doch sei hervorgehoben, daß in wechselnden Verhältnissen schließlich ein Teil der Gewebseiweißkörper wasserunlöslich wird, somit rasches Verarbeiten wohl immer zu empfehlen ist.

II. Eigenschaften der Organplasmen.

Das Organplasma gibt alle Farben- und Fällungsreaktionen der Eiweißkörper, so z. B. eine positive Glyoxylsäure-, positive Xanthoprotein- und *Millon*sche Reaktion.

Mit Neutralsalzen kann man Fällungen erzwingen.

So gibt konzentrierte Kochsalzlösung innerhalb 24 Stunden flockige Fällung: das Filtrat gibt auf Eintragen von Kochsalz in Substanz neuerlich einen Niederschlag; das Filtrat hievon, verdünnt, gibt wieder mit Ammonsulfat Fällung und selbst das weitere Filtrat läßt auf Säurezusatz noch spärliche Flocken ausfallen. Bei Verwendung konzentrierter Ammonsulfatlösung ist eine deutliche, spatiengesonderte, fraktionierte Scheidung in verschiedene Eiweißindividuen n i c h t möglich.

Die Eigenschaften solcher Organplasmen ähneln in vielem den durch ein homologes Verfahren gewonnenen Muskelplasmen. Schon durch die bekannte *Miescher*sche Beobachtung vom Schwund

[1]) *W. Wiechowski*: Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe; *Hofmeisters* Beiträge. **9**. 240 (1907). Ferner eine Verbesserung des Verfahrens vom gleichen Autor. Biochem. Zeitschr. **81**. 278 (1917), bestehend in Überziehung der Glasplatten mit hochschmelzendem Paraffin.

der Muskelsubstanz beim Aufbau der Genitaldrüsen des Lachses ist eine gegenseitige Beziehung zwischen Muskel und parenchymatösen Organen zu vermuten. Immerhin bestehen zwischen Muskel- und Organplasma deutliche Unterschiede[1]).

Aus den Organplasmen läßt sich durch verdünnte Essigsäure (0·1 bis 0·2%), besonders sicher nach Zusatz kleiner Mengen gesättigter Kochsalzlösung (z. B. auf 100 cm^3 Plasma 5 bis 6 cm^3 konzentrierter Kochsalzlösung) ein flockig ausfallender Körper gewinnen, der im Gegensatz zur Säurefällung aus verdünntem Serum-(Para-)globulin in Neutralsalzen unlöslich ist, er sei in folgendem als Essigsäurekörper bezeichnet.

Dieser Eiweißkörper ist optisch inaktiv, durch Diffusion nicht fällbar, sondern nur in Form einer opaleszenten visziden Kolloidlösung zu erhalten. Die Kolloidlösung koaguliert nicht, gewinnt aber dieses Vermögen sofort auf Salzzusatz und ebenso wird die Essigsäurefällung bei einer solchen diffundierten Lösung erst nach Salzzusatz möglich. Durch Pepsineinwirkung ist der Organeiweißkörper bis auf kleine Reste vollkommen verdaulich. Höchst eigenartig und sicher von biologischer Bedeutung ist seine Koagulationstemperatur. Er koaguliert (sowohl im nativen Plasma, als auch aus der Säurefällung in Alkali gelöst) bei auffallend niedriger Temperatur, bei 38 bis 39° vollständig, ja selbst bei 35° und partiell noch bei tieferer Temperatur. Die Plasmalösungen haben überhaupt, ähnlich wie sonst Globuline, die Tendenz, allmählich schon bei Zimmertemperatur auszufallen. Diese Koagulationsfähigkeit wird aufgehoben oder gehemmt durch Blutserum bezw. die Bluteiweißkörper. Kalziumzusatz zum Blutserum hebt dessen hemmende Wirkung auf.

Die analytische Zusammensetzung des Essigsäurekörpers erhellt aus folgenden Werten zweier Bestimmungen:

	I	II
C	47·21%	48·43%
N	16·35%	16·71%
H	6·79%	6·98%
S	0·97%	0·99%
P	—	1·3%

Mit Rücksicht auf die Koagulationsfähigkeit, die fast restlose Verdaulichkeit, der Ausfällbarkeit durch schwache Säuren, wie Kohlensäure, die Salzfällungsgrenzen, die Ungiftigkeit bei intravenöser Injektion war ich anfangs geneigt, diesem Körper Globulinnatur zuzuschreiben. Schon in meiner ersten Mitteilung schrieb ich, daß aber doch auf eine Beziehung zwischen dem Plasmaglobulin

[1]) Näheres über dieses Verhalten siehe in meiner Arbeit „Über Organeiweiß". *Hofmeisters* Beiträge. **7.** S. 390. 1905.



und den Nukleoproteiden einzugehen sein wird. „Speziell wird das *Hammarsten*sche *a*-Nukleoproteid des Pankreas, das dem Gewebsfibrinogen (*Wooldridge*), dem Zellglobulin (*Halliburton*), dem Muskelalbumin nahestehen soll, sowie auch das *Wohlgemuth*sche Leberprotein zu besprechen sein.“ Vor allem aber ist das mir damals entgangene *Umber*sche Pankreasproteid hier einzubeziehen. Nun konnte ich seitdem feststellen, daß der Essigsäurekörper typische Orzinreaktion gibt.

Das Absorptionsband des Orzinfarbstoffes in Amylalkohol war z. B. bei Arabinose zwischen C und D bezw. zwischen 88·5 und 102, bei einem Schweinsleberessigsäurekörper zwischen 89·5 und 99 der Skala meines Spektralapparates.

Der Komplex enthält somit sicher eine P e n t o s e. Der Reichtum der Organe an Pentosen erhellt bereits aus früheren Befunden: ich erinnere nur an die quantitative Studie von *Grund*[1]), der unter Benützung des Furfurolverfahrens für eine Leber allein einen Gehalt von 1·85, für den Muskel einen solchen von 7·38 annimmt und bereits auf die große prinzipielle Bedeutung seines Befundes hinweist. Es scheint mir wichtig, zu betonen, daß auch in den Organplasmen pentosehaltige Eiweißkörper von geradezu universeller Verbreitung vorliegen.

Ferner ließ sich im Essigsäurekörper nach Salzsäurehydrolyse ein P u r i n k ö r p e r nachweisen. Verfuhr ich nach dem *Umber*schen Verfahren, so erhielt ich kein Guanin, wenn ich aber die eingeengte Schlußlösung mit ammoniakalischem Silber fällte, den mit Schwefelwasserstoff zersetzten Niederschlag filtrierte und eingengte, so gab die Lösung die charakteristische Salpetersäurereaktion, die Sublimatreaktion positiv, die *Weidel*sche Chlorreaktion blieb negativ. Trotz der kleinen Mengen des Ausgangsmaterials, wodurch naturgemäß nur qualitative Reaktionen vorgenommen werden konnten, entscheiden diese Erfahrungen, daß der Essigsäurekörper ein N u k l e o p r o t e i d ist, wofür sich seither auch *Hammarsten*[2]) ausgesprochen hat.

Die Bezeichnung Nukleoproteid ist in chemischem Sinne zu nehmen, dem Kern allein gehören die löslichen Organeiweißkörper nicht an.

Am nächsten steht der Körper dem *Umber*schen Pankreasproteid und ist vielleicht mit ihm identisch. Den Umfang der Verdaulichkeit desselben lehren folgende Zahlen: 1·06 chlorfrei gewaschener und getrockneter Hundeleberessigsäurekörper hinterläßt nach mehrtägiger Pepsinsalzsäureverdauung einen unansehnlichen, braun pigmentierten Rückstand von 0·011 *g*.

---

[1]) *Grund*: Über den Gehalt des Organismus an gebundenen Pentosen. Zeitschr. f. phys. Chem. **35**. 161 (1902).

[2]) *Hammarsten*: Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. 1910.

Zur erschöpfenden Charakteristik eines Eiweißkörpers gehört neben der Feststellung der Eigenschaften des unveränderten genuinen Stoffes die Beschreibung seiner Spaltungsprodukte. Da aber weder die *Emil Fischer*sche Methode der Aminosäurebestimmung und noch weniger das *Kossel-Kutscher*sche Verfahren der Basenbestimmung quantitativ sind, es außerdem mir nicht möglich war, jene großen Mengen an Material darzustellen, wie sie zur Anwendung dieser Methoden Voraussetzung sind (eine ganze Schweinsleber liefert nur 325 *g* lufttrockenes Pulver, aus dem nach Behandlung mit Toluolazeton nur 8·2 *g* unseres Körpers gewonnen werden, ebenso aus 10 *kg* frischer Rindsleber nur 23 *g*), so bediente ich mich des *Pfaundler-Gümbel*schen Verfahrens zur Bestimmung der N-Verteilung, siehe Tabelle 1.

Zur Beurteilung der gewonnenen Zahlen sei hervorgehoben, daß im Gegensatz zu den Bluteiweißkörpern eine Reinigung des Essigsäurekörpers in strengem Sinne nicht möglich ist; während man Globulin, Albumin mit den fällenden Salzlösungen auswaschen, wiederholt lösen und fällen kann, ist dies hier nicht zulässig. Beim Auflösen des sauren Niederschlages in Alkali bildet sich äußerst leicht Alkalialbuminat. Beim Neutralisieren entweicht Schwefelwasserstoff, ein Beweis für eine stattgehabte Zystinzersetzung. Die Proben sind dann niemals klar und geben im Gegensatz zum ursprünglichen Plasma bereits mit einem Sechstel Ammonsulfat reichliche Niederschläge.

Tabelle I.

N-Verteilung im Essigsäurekörper.

	I	II	III	IV	V	VI		
	Menschenleber	Menschen-Amyloidleber	Schweinsleber	Dieselbe Schweinsleber	Rindsleber	Dieselbe Rindsleber	Globulin nach *Hausmann*[1])	Albumin nach *Rothera*[2])
Gesamt-N in % . .	16·00	15·9	15·98	15·98	15·24	15·24	15·83	15·93
NH_2-N . .	7·06	8·1	7·77	7·0	7·79	7·2	8·9	6·47 [3])
Monoaminosäure-N .	61·5	61·4	63·64	59·4	66·05	66·5	68·3	62·6[3])
Melanin- u. Diaminosäure-N .	31·43 ber.	3·8 26·7	0·53 28·06	1·37 32·23	1·47 24·49	1·74 25·0	24·9 best.	32·0[3])
		30·5	28·59	33·60	25·96	26·74		

[1]) *Hausmann*: Über die Verteilung des Stickstoffes im Eiweißmolekül. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27. 104. Tabelle IV. (1899).

[2]) *Rothera*: Zur Kenntnis der Stickstoffbindung im Eiweiß. *Hofmeisters* Beiträge. V. 447 (1904).

[3]) Die Zahlen = Prozent des Gesamt-N.

Die Tabelle zeigt, daß der Essigsäurekörper sich im wesentlichen den Serumeiweißkörpern nähert, es fällt z. B. das Mittel der Monoaminosäuren mit 63% zwischen die entsprechenden Globulin- und Albuminwerte.

Neben dem durch 0·2% Essigsäure fällbaren Körper enthalten die Plasmen noch einen zweiten Eiweißkörper. Derselbe ist durch gleich niedrige Temperatur, wie der erste, nicht ausfällbar, ist ebenfalls inaktiv und nach dem positiven Ausfall der Orzinreaktion pentosenhaltig, somit wohl ebenfalls ein Nukleoproteid. Doch sei hervorgehoben, daß sich das Spektralband der amylalkoholischen Lösung in Einzelnheiten etwas anders verhält als das des ersteren. Hat man ein Plasma mit 0·2%iger Essigsäure ausgefällt, sättigt das Filtrat mit Ammonsulfat in Substanz, so erhält man das zweite Proteid mit den eben beschriebenen Eigenschaften.

1913 zeigt *Wiener*[1]), daß unser Essigsäurekörper durch 2% Formol aus seinen Lösungen fällbar ist, während im Blutserum kein mit Formol wirklich fällbarer Eiweißkörper vorhanden ist.

Fasse ich zusammen, so ergibt sich, daß die löslichen Organeiweißkörper trotz der Ähnlichkeit der Gesamtanalyse und Gesamthydrolyse toto coelo vom Blutserum verschieden sind.

Nach Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung kann man die Organpulver noch mit 0·05% Soda extrahieren, die Rückstände durch Diffusion aufschließen. Die möglichen Verfahren zur Aufstellung einer Gesamtbilanz der Eiweißkörper eines Organs, wie sie sich auf Grund vorstehender Erfahrungen entwickelt haben, sind von *Wiechowski*[2]) zusammengefaßt worden und mögen hier wegen ihrer allgemeinen Anwendbarkeit noch einmal Platz finden.

Tabelle 2.

Schema I.

Organ, ausgespült bei 30° getrocknet, mit Toluol vermahlen und erschöpft

I. Toluolextrakt — Rückstand mit Alkohol erschöpft

II. Alkoholextrakt — Rückstand mit 0·8%iger Kochsalzlösung erschöpft (Filtration)

III. Filtrat „Plasma" — Rückstand mit 0·05%iger Sodalösung erschöpft (Filtration

IV. Filtrat — Rückstand (in Säuren u. Laugen lösl. Eiweißkörper

[1]) *Wiener*: Studien über Zelleiweiß mit Hilfe der Formoladdition. Bioch. Ztg. **56**. 122.

[2]) *Wi·chowski*: l. c *Hofmei sters* Beiträge. **9**. 232 (1907).

Schema II.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0·8%iger Na C-Lösung vermahlen und auf dem Filter eiweißfrei gewaschen

„Plasma" | Rückstand mit 0·05%iger Soda vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert, dann zentrifugiert

Opaleszentlösliche Organfraktion zusammen bei Fraktion IV des vorhergehenden Schemas | Rückstand

Schema III.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0·05%iger Sodalösung vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. Suspension gegen 0·05% Sodalösung dialysiert, hierauf mit der gerade ausreichenden Menge Kaliumazetat gefällt und filtriert, Umfällen, bis das Filtrat eiweißfrei ist

Filtrat-Plasma + Fraktion IV des Schema I | Rückstand nach Dialyse zentrifugiert und durch Zentrifugieren völlig ausgewaschen

V. Zentrifugat opaleszent | VI. Rückstand

III.

Das Arbeiten mit Organen erstrebt verschiedene Ziele, von denen die wesentlichsten hier angeführt werden mögen:

a) Die Feststellung spezifischer Giftwirkungen und Leistungen derselben (Nebenniere, Hypophyse, Schilddrüse),

b) Darstellung von Zytotoxinen, Antikörpern,

c) Fermentisolierung und Fermentbestimmung,

d) Änderung ihrer quantitativen Zusammensetzung unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen.

Die folgenden Ausführungen können sich nur mit dem letztgenannten Problem befassen, da die ersteren bereits an anderen Stellen dieses Werkes eine zusammenfassende Darstellung gefunden haben.

Die nachgewiesene Möglichkeit der Isolierung einzelner Organeiweißkörper gestattet nunmehr, an bestimmte biologische Fragen heranzutreten.

Vor allem erhebt sich die Frage: Ändert sich die Zusammensetzung eines Organes in bezug auf seine Eiweißkörper bei bestimmten Erkrankungen?

Als Beispiel einer Methodik in dieser Richtung sei auf die Studie *Orgelmeisters*[1]) über die Änderung des Eiweißbestandes der Niere durch Entzündung hingewiesen.

[1]) *Orgelmeister*: Änderung des Eiweißbestandes der Niere durch Entzündung. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. 3. 221 (1906).

Zur Feststellung von Veränderungen dieses Organplasmas wurde in diesen Versuchen, die nunmehr schon einige Jahre zurückdatieren, ähnlich wie es sonst beim Blutserum üblich ist, durch Bringen des Nierenplasmas auf eine Konzentration von 25, 33 und 50% Ammonsulfat eine quantitative Vorstellung über die Zusammensetzung des Organs gewonnen. Die Nieren werden, womöglich unmittelbar nach dem Tode des Tieres, direkt von der Arteria renalis aus mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült und möglichst vollkommen vom Blute befreit.

Wegen des ziemlich großen Widerstandes, den die Flüssigkeit in den Nierengefäßen findet, eignet sich hiezu am besten eine 50 bis 100 cm^3 fassende Spritze. Zur Ausspülung benötigt man nur einige Minuten. Hierauf werden die Nieren von der Kapsel und den Hilusgefäßen befreit, zerkleinert, der Brei gewogen, mit der doppelten Gewichtsmenge physiologischer Kochsalzlösung und einigen Tropfen Toluol versetzt und in einen verschlossenen Glaszylinder aufbewahrt; das Filtrat wird nun, wie oben ausgeführt, fraktioniert. In der Norm ergab sich das Verhältnis von

33% Sättig. (homolog m. Euglob.) : 50% Ges.-Glob. (Eu- u. Pseudgl.):
6 : 55·5 :
100% Sättig.
100

Bei allen Formen akuter Nephritis trat nun eine derartige Veränderung ein, daß es auf Kosten der dritten Fraktion zur Vermehrung der ersten und zweiten kam. Zum Beispiel war das Verhältnis nach Sublimatnephritis 37 : 77 : 100. Nach Kaliumbichromat 30 : 64 : 100, Jodoform 15·9 : 65 : 100, Diphtherietoxin 24 : 92 : 100, somit lehren diese Zahlen die Bildung von Globulin aus Albumin. Weitere Details mögen in der Originalarbeit nachgesehen werden.

Zur Feststellung quantitativer Organveränderungen bediene ich mich seither eines empfehlenswerten Verfahrens: Das, wie oben beschrieben, erhaltene Organpulver wird in bestimmten Mengen bald mit, bald ohne vorhergehende Toluolextraktion in der Pulvermühle[1]) mit physiologischer Kochsalzlösung zerrieben und gewöhnlich in 1%iger Lösung nach Toluolzusatz 24 Stunden stehen, bezw. um eine völlige und gleichmäßige Extraktion zu ermöglichen, verschlossen iegen gelassen. Vom Filtrat wird ein möglichst großer Teil (z. B. 50 cm^3) nach Zusatz von etwas gesättigter Kochsalzlösung mit 0·2%iger Essigsäure ausgefällt. Die Fällung wird nach mehrstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 0·8%iger Kochsalzlösung eiweißfrei, dann mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen,

[1]) *Wiechowski*: Dieses Handbuch. 3. 297 (1910).

schließlich nach Behandlung mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen und auf das Gesamtvolumen bezw. immer auf 1 *g* Organpulver berechnet. In einer weiteren Probe, z. B. 25 cm^3, bestimmt man Gesamteiweißgehalt des Plasmas und eigens den Gesamteiweißgehalt des Organpulvers. Man vergleicht somit pro Gramm Organpulver Gesamteiweißgehalt mit dem Gehalt der in physiologischer Kochsalzlösung löslichen Eiweißkörper und der Menge des Essigsäureproteids unter den verschiedenen biologischen Verhältnissen.

Es folgen zunächst Beispiele über den Einfluß des Hungers auf den Eiweißquotienten, auf die Eiweißbilanz. Es ist längst bekannt, daß im Hunger die einzelnen Organe an Gewicht abnehmen, und zwar in verschiedenem Ausmaße. Die Verteilung dieser Abnahme auf die einzelnen Eiweißkörper war erst festzustellen. Zum Vergleich müssen zunächst Normalwerte angeführt werden.

Tabelle 3.

Normalkaninchen, 2 *kg* Gewicht, Leber mit Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	1		2	
Gesamteiweiß pro 1 *g* trockenes Pulver	0·66	100%	0·6239	100%
Gesamteiweiß pro 100 cm^3 Plasma 1 : 100	0·17	25·7%	0·175	28%
0·2%ige Essigsäurefällung in 100 cm^3 Plasma	0·12	18·2%	0·112	17·9%

Tabelle 4.

Hungerversuche, Kaninchen, Leber mit Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	3		4		5	
Gewicht zu Beginn des Versuches	14./II. 1550		14./II. 1450		7./XII. 2700	
Gewicht zu Ende des Versuches	21./II. 860		23./II. 1030		19./XII. 1980	
Gesamteiweiß pro 1 *g* trockenes Pulver	0·83	100	0·735	100	0·559	100
Gesamteiweiß des Plasmas aus 1 : 100	0·038	4·7	0·0125	1·6	0·115	20
0·2%ige Essigsäurefällung in 100 cm^3 Plasma	0·022	2·6	0·012	1·6	0·088	15

Beim normalen Kaninchen sind somit 25 bis 28% des Lebereiweißes kochsalzlöslich, davon der größte Teil der Essigsäurekörper.

Die Zahlen zeigen, daß beim Kaninchen durch Hunger eine Verschiebung der Organeiweißquotienten stattfindet. Das Schwinden der Fette und Kohlehydrate erklärt die absolute Zunahme der Gesamteiweißwerte; die wasserlöslichen Eiweißkörper sind stark vermindert. Sie wurden somit sicher zur Zersetzung, zur Befriedigung des Eiweißbedürfnisses herangezogen, ein Moment, das auf ihre physiologische Dignität hinweist. Dieser Versuchstypus ist wohl als Grundlage für fernere Versuche über die Assimilation zu verwerten. Welcher Art müssen die Eiweißkörper sein, die am schnellsten zur Wiederherstellung des normalen Eiweißgleichgewichts führen? Sind die abiureten Spaltungsprodukte — im ganzen oder fraktioniert — auch in dieser Richtung imstande, die nativen Nährstoffe zu ersetzen? Als Grundlage für diese und ähnliche Versuche ist es wünschenswert, die Karnivoren heranzuziehen: diesem Zwecke dienen folgende Tabellen.

Tabelle 5.

Normalhundeleber, Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	6		7		8		9	
Gesamteiweiß pro 1 *g* . .	0·67	100%	0·69	100%	0·747	100%	0·75	100%
Gesamteiweiß pro 100 *cm*³ Plasma 1 100	0·209	31%	0·217	32%	0·25	33·4	0·24	33·4%
0·2%ige Essigsäurefällung lung auf 1 *g*	0·127	18%	0·123	18·3%	0·18	24%	0·16	21%

Tabelle 6.

Hundeleber, Hungerversuche.

Versuchs-Nr.	10		11		12a Leber		12b Niere	
Gewicht zu Beginn . .	4./XII. 6200		2./I. 8600		6./II. 8600		8600	
Zu Ende des Versuches .	12./XII 5000		10./I. 7200		24./II. 6450		6450	
Gesamteiweiß pro 1 *g* . .	0·746	100%	0·794	100%	0·758	100%	0·625	100%
Gesamteiweiß Plasmas von 1 *g* (auf 100)	0·164	21·9%	0·263	15%	0·287	37%	0·166	26·4%
0·2 Essigsäure auf 1 *g* . .	0·109	14·5%	0·119	33%	0·208	26%	0·132	20·8%

Trotz andauernden Hungern ist also beim Hunde zwar ein Zurückgehen, aber kein dem Kaninchen homologes mächtiges Absinken des Essigsäurekörpers der Leber zu verzeichnen (siehe die Prozentzahlen). Hier spielen gewiß Rasse und Fütterungsart vor dem Hungerversuch sehr bedeutsam mit. So war es merkwürdig, wie munter der letzte Hund trotz 18tägigem Hungern war: voll Temperament und Beweglichkeit konnte er nach dieser Zeit kaum zum Stillstehen auf der Wage gebracht werden. Gerade für Giftwirkungen, die am Hunde quoad Einflußnahme auf das Organeiweiß durchzuführen sein werden, ist es von Wichtigkeit zu wissen, daß der verringerten Nahrungsaufnahme für die Leberzahlen keine rasch eintretende Bedeutung zukommt.

Von der Vorstellung ausgehend, daß in der Darmwand als der Stelle der Eiweißsynthese oder der Eiweißanhydrierung sich Ansatz oder Verbrauch äußern könnte, wurde in folgenden Versuchen der Gehalt der Darmschleimhaut an unseren Eiweißkörpern unter wechselnden Verhältnissen bestimmt (Tabelle 7).

Tabelle 7.

Darmschleimhautversuche.

Gefütterte Hunde.

Versuchs-Nr.	13		14	
Gesamteisweiß pro 1 *g* .	0·738	100%	0·75	100%
Plasmaeiweiß pro 1 *g* .	0·3004	40·6%	0·254	33·88%
Essigsäurekörper pro 1 *g*	0·15	20·2%	0·18	24%

Hungerhunde.

Versuchs-Nr.	15		16		
Bemerkung . . .	2 Hungertage		15 Hungertage		Tier des Versuchs 16 von 26·15 auf 20·35 *kg* abgenommen, wird verblutet.
Gesamteiweiß pro 1 *g*	0·767	100%	0·804	100%	
Plasmaeiweiß pro 1 *g*	0·192	25%	0·180	22·4%	
Essigsäurekörper pro 1 *g*. . . .	0·11	14·9%	0·087	10·8%	

Die Hungerdarmschleimhautversuche des Hundes stimmen prinzipiell mit den Leberhungerversuchen am Kaninchen die absoluten Eiweißmengen pro Gramm Organpulver gehen in die

Höhe, die löslichen Eiweißkörper, insbesondere die Essigsäurekörper, schwinden beträchtlich.

Von Giften, die den Eiweißbestand angreifen und von denen ein Einfluß auf die Leber zu erwarten war, wählte ich Phosphor und Arsenik[1]).

Versuch 17. Ein 1750 *g* Kaninchen erhält 0·01 P in 0·2%iger Öllösung per os am 12./I. Am 15./I. tot. Die Sektion ergibt maximale Leberverfettung.

Die pro 1 *g* mit Toluol behandelten Pulvers erhobenen Werte der Leber waren: Gesamteiweiß = 0·782, lösliche Eiweißkörper = 0·0984, mit Essigsäure fällbar = 0·065.

Der Vergleich mit den Normalzahlen S. 595 ergibt somit eine deutliche Verarmung an löslichen Eiweißkörpern!

Wesentlich übereinstimmend verläuft die orale Phosphorintoxikation am Hunde:

Versuch 18. Hund 6400 erhält 5 cm^3 Phosphoröl (0·2 auf 100) per os. Am dritten Tag 4400, tot vorgefunden. Typische Fettleber.

Die Eiweißwerte Gesamteiweiß = 0·790 lösliche Eiweißkörper = 0·118, Essigsäurekörper = 0·055.

Die schwere Schädigung der Leber beziehe ich auf den direkten Insult durch das mit Phosphor überladene Blut, eine Intoxikationsform, wie sie gewöhnlich beim Menschen vorkommt.

Führt man den Phosphor subkutan zu, dann ist die Lebereiweißschädigung trotz hochgradiger Verfettung nicht nachweisbar gewesen.

Versuch 19. Hund 7820 erhält an 5 Tagen je 1 cm^3 0·2%iges Phosphoröl subkutan. Am sechsten Tage 6950, wird verblutet. Leber: mikroskopische Fettinfiltration.

Eiweißverteilung: Gesamteiweiß pro 1 *g* = 0·724, lösliches Eiweiß = 0·257, Essigsäure fällbar = 0·1548.

Hier ist als Maß der Intoxikation die Fettbestimmung entscheidend. Jedenfalls zeigt der Versuch, was bei der Proteusnatur der Vergiftungsbilder mit P ohnehin zu erwarten, daß sich eine hochgradige Störung des Fettgehalts völlig unabhängig vom Eiweißbestande vollziehen kann.

Über den Verlauf der Arsenikversuche nur kurz folgendes:

Versuch 20. Kaninchen von 1030 *g* fällt nach zweimal 0·02 *g* As_2O_3 p. K. in 4 Tagen auf 900 *g* Gewicht.

1 *g* Leberpulv. gibt	0·7 Ges.-Eiw. m.	0·11 Plasmaeiw. u.	0·07 Essigs.-K.
in Prozenten:	100 :	15 :	10

[1]) Siehe die zu ähnlichen Resultaten gelangende Arbeit von *B. Slowtzoff*, Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern. Biochem. Zeitschr. **31**. 227 (1911). Ferner *Slowzoff* und *Ssobelew*: l. c. **31**. 234 „Über chemische Veränderung in der Leber bei einigen pathologischen Prozessen.



V e r s u c h 21. Kaninchen von 1620 *g* fällt nach zweimal 0·02 *g* As_2O_3 p. K. in 3 Tagen auf 1470 *g* Gewicht.

1 *g* Leberpulv. gibt 0·73 Ges.-Eiw. m. 0·137 Plas.-Eiw. u. 0·098 Essigs.-K.
in Prozenten: 100 : 18 : 13·4

In ähnlicher Weise geht nach wiederholten A d e r l ä s s e n, die unter starker Gewichtsabnahme bis zum Tode der Tiere durchgeführt werden, die Menge des Essigsäureproteids beträchtlich herunter.

Und so läßt sich, die vorstehenden Erfahrungen zusammenfassend, der Satz aufstellen, daß jeder zu deutlichem Gewichtsverlust führende Prozeß, möge er auf welche Art auch immer ausgeführt worden sein, sich in einer mehr minder deutlichen Abnahme unserer Leberproteide spiegelt: eine S p e z i f i t ä t kommt diesem Befund nicht zu. So möchte ich noch erwähnen, daß I m m u n i s i e r u n g von Tieren mit heterologem Serum bis zum Auftreten kräftigster, schon bei Zimmertemperaturer erfolgender Präzipitation durchaus zu keiner Änderung der Eiweißquotienten zu führen braucht, falls die Tiere keine Gewichtsabnahme zeigen. Tritt aber der letztere Fall ein, so kommt es auch hier zur beschriebenen Änderung im Organeiweißbestand.

Vorstehende Ausführungen mögen die Anregung zu weiteren Versuchen mit Bestimmung der Eiweißkörper der Organe unter wechselnden Bedingungen geben. Ich schließe mit folgendem Ausspruch *E. Abderhaldens*[1]): „Organeiweiß“ unter normalen und pathologischen Verhältnissen zu untersuchen, hat viel Verlockendes für sich. Es ist ein reizvoller Gedanke, dem rein morphologischen Studium pathologischer Zellabartungen eine genauere Kenntnis der Lebensprozesse der veränderten Zelle an di eSeite zu setzen, denn, daß nicht äußere Strukturverschiebungen das Wesen krankhafter Prozesse ausmachen, sondern ganz offenbar in erster Linie Veränderungen im gesamten Stoffwechsel der Zelle, ist ganz klar.“

[1]) *E. Abderhalden*, Klinische Eiweißuntersuchungen. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. 2. S. 648. 1906.

Darstellung und Untersuchung eines wohldefinierten Eiweißstoffes.

Von **Hans Jessen-Hansen**, Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.

EINLEITUNG.

Die Angabe der Reinheit ist ein wesentlicher Teil der Definition eines Körpers.

Die Reinheit eines Körpers gibt man gewöhnlich in Prozenten entweder des „reinen“ Stoffes oder der „Verunreinigungen“ an, was indessen von der Bedeutung der solcherweise angegebenen Reinheit keine gute Vorstellung gibt. Denn da das Molekül als der eigentliche Träger der Eigenschaften der Körper bezeichnet werden muß, und da die Kräfte, welche die Körper in neuen umwandeln, sich zwischen den Molekülen betätigen, so kann man nicht erwarten, daß ein Körper die einem bestimmten chemischen Individuum zukommenden Eigenschaften einigermaßen unverzerrt zeigen soll, wenn er nicht wenigstens der Hauptsache nach nur aus den Molekeln dieses bestimmten Individuums besteht und nur verhältnismäßig wenige von anderen Molekeln enthält. Man würde deshalb einen in mehreren Beziehungen deutlicheren Begriff von der Reinheit eines Körpers bekommen, wenn man dieselbe nicht nach Gewichtsprozenten, sondern nach Molekülgewichts-, oder kürzer, Molprozenten ausdrückte. Ein Beispiel mag dies verdeutlichen: Natronhydrat mit 1 Gewichtsprozent Chlornatrium enthält 99·3 Molprozente Natronhydrat, Chininchlorhydrat mit 1 Gewichtsprozent Na Cl dagegen nur 93·6 Molprozente Chininsalz, und ein Eiweißstoff mit dem Molekül = etwa 40.000, welches 1 Gewichtsprozent Na Cl enthält, hat nur 12·6 Molprozente Eiweiß.

Man konnte hier fragen: Wie groß muß die molprozentische Reinheit sein, damit man mit einiger Sicherheit erwarten darf, daß die Eigenschaften des „reinen Stoffes“ die vorherrschenderen seien? Man würde wohl beim ersten Blick geneigt sein zu meinen, daß wenn das Molprozent des „reinen“ Stoffes größer als 50 ist, also mehr Moleküle des „reinen“ Stoffes als der „fremden“ vorhanden, dann würde man berechtigt sein anzunehmen, daß der „reine“ Stoff der bestimmende sein wird. Dies würde indessen

nur dann zutreffen, wenn die „fremden“ Moleküle sich den „reinen“ gegenüber neutral verhielten; wenn dieses nicht der Fall ist — und das wird wahrscheinlich nur sehr selten, ob überhaupt jemals, eintreffen —, dann muß von den „reinen“ Molekülen wenigstens mehr als doppelt so viel als von den „fremden“ vorhanden sein, damit die Eigenschaften des „reinen“ Stoffes dominieren sollen; man muß nämlich annehmen oder kann jedenfalls befürchten, daß jedes „fremde“ Molekül eine Verbindung mit einem „reinen“ eingeht, so daß in dieser Weise ein Teil der „reinen“ Moleküle in andere umgewandelt und somit das Molprozent des „reinen“ Stoffes reduziert sein kann.

Man wird aus diesen Überlegungen verstehen, daß man, wenn man es mit hochmolekulären Körpern wie die Eiweißstoffe zu tun hat, viel größere Ansprüche auf prozentische Reinheit — und damit auf die analytische Genauigkeit — stellen muß als bei Körpern mit kleinen Molekülen, falls man wirklich von einem „reinen“ Stoff zu reden berechtigt sein soll; ja man kann wohl, ohne großen Widerspruch zu befürchten, sagen, daß „reine“ Eiweißstoffe sich überhaupt nicht darstellen lassen. Daraus folgt indessen, daß eine Definition eines Eiweißstoffes, wenn sie ihren Zweck erfüllen soll, d. h. ein Mittel dazu sein, das Reproduzieren und Identifizieren des betreffenden Körpers zu ermöglichen, notwendigerweise auch die genaue Definition der „Verunreinigungen“, sowohl der Art als auch der Menge nach, enthalten muß. Da weiter die elementäre Zusammensetzung allein einen nur einigermaßen zusammengesetzten Körper, geschweige denn einen Eiweißkörper, nicht genügend definiert, sondern dazu auch noch die zahlenmäßige Angabe einer oder mehrerer anderen Eigenschaften verlangt wird, und diese mit der Art und Menge der „Verunreinigungen“ variieren können, so muß eine Angabe dieser Variation, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, auch noch als zur Definition notwendig erachtet werden.

Eine diesen Anforderungen genügende Definition des in Hühnereiern vorkommenden „kristallisierbaren Albumines“ hat *S. P. L. Sörensen* und seine Mitarbeiter gegeben[1]), und diese Definition nebst der analytischen und präparativen Methoden, auf welchen sie fußt, bildet den Inhalt dieser Abhandlung.

A. Definitionen.

a) Allgemeines.

Der Eiweißstoff, welcher den Hauptbestandteil des Eierklars der Hühnereiern ausmacht, besitzt die folgenden charakteristischen Eigenschaften:

---

[1]) Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** (1915/1918); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 1 ff.; **106.** 1 ff. (1919).



Er ist ein amphoterer Stoff, der in Wasser sehr leicht löslich ist. Ob diese Lösung eine kolloide ist oder nicht, mag dahingestellt bleiben. Sie verhält sich in allen hier zu erwähnenden Beziehungen wie eine echte Lösung. Die Reaktion dieser Lösung ist schwach sauer, damit übereinstimmend, daß der isoelektrische Punkt des Albumins der Wasserstoffionenkonzentration $C_H = 15 - 16 \times 10^{-6}$ oder dem $p_H = 4 \cdot 8$ [1]) entspricht.

Das Albumin ist auch in verdünnten Lösungen von Ammoniumsulfat leicht löslich; mit zunehmendem Ammoniumsulfatgehalt der Lösung nimmt aber die Löslichkeit des Albumins ab, und bei etwa Halbsättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat ist sie beinahe gleich Null. Mit nicht zu verdünnten Ammoniumsulfatlösungen bildet das Albumin leicht übersättigte Lösungen, aus welchen es sich unter angemessenen Bedingungen in kristallinischer Form als Sulfat (im folgenden kurzheitshalber Eisulfat) ausscheidet.

b) Kristallform.

Die Kristalle sind scheinbar rhombisch und haben die Form sehr regelmäßiger Linealen; die größeren Kristalle haben die

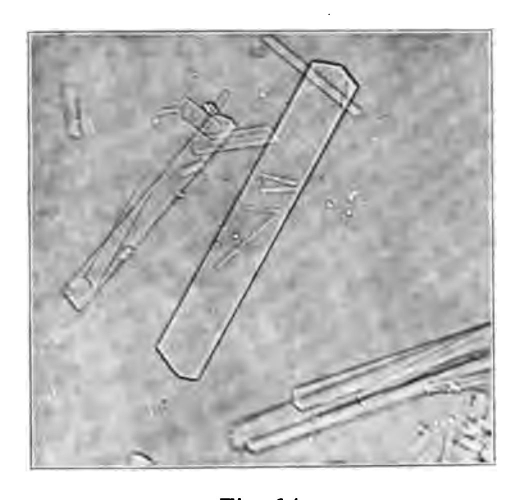


Fig. 14.

Dimensionen zirka $0 \cdot 2 \times 0 \cdot 015 \times 0 \cdot 001$ *mm*. Die Enden werden von einem Doma begrenzt, dessen Flächen einen Winkel von etwa 40° miteinander bilden (mit der Längenrichtung etwa 70°). Die Kristalle sind farblos. Die Lichtbrechung ist bedeutend größer als die der umgebenden Flüssigkeit; es ist von Doppelbrechung nicht die Spur sichtbar.

[1]) Durch p_H bezeichnet man den Logarithmus der Anzahl Liter, welche 1 *g* (-Äquivalent) Wasserstoffionen enthält.

c) Zusammensetzung der Kristalle.

Die bei der dem $p_H = 4{\cdot}58$ entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration gebildeten Kristalle enthalten 12·72% Stickstoff, 17·67% Wasser und zirka 0·36% Schwefelsäure oder etwa 1 Äquivalent $H_2 SO_4$ auf 125 Äquivalenten Proteinstickstoff.

d) Gleichgewichtsbedingungen zwischen Lösung und Kristallen.

Die Kristallisationsbedingungen, d. h. der Gehalt der kristallisierenden Lösung an Protein, Ammoniumsulfat und Wasserstoffionen sowie die Temperatur sind innerhalb jedenfalls ziemlich weiter Grenzen ohne Einfluß auf den Wassergehalt der Kristalle. Dagegen bewirkt eine Änderung der Wasser-

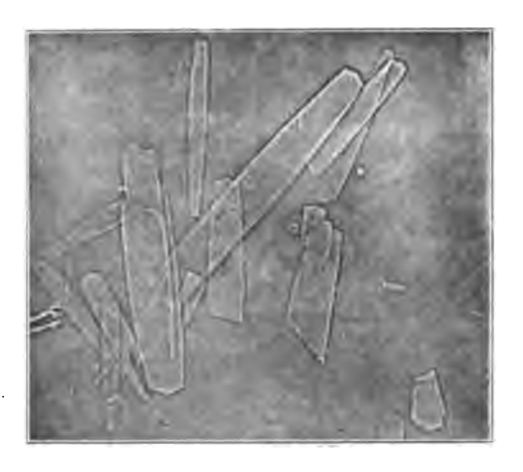


Fig. 15.

stoffionenkonzentration insofern eine Änderung der Zusammensetzung des kristallisierten Körpers, als Kristalle, die bei stärkeren Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeschieden sind, etwas mehr Schwefelsäure, während die bei niedrigerer Konzentration der Wasserstoffionen gebildeten auch noch ein wenig Ammoniak enthalten. Die letztgenannten Kristalle behalten indessen die Gestalt unverändert, während die in saurer Lösung gebildeten eine andere, zugespitzte Form annehmen (siehe Fig. 15). Dieses Verhalten läßt sich am einfachsten dahin deuten, daß bei starker Wasserstoffionenkonzentration sich ein schwefelsäurereicheres (saures) Salz bildet, während bei schwacher etwas Ammoniak von dem „normalen“ Salz gebunden wird.

Die Geschwindigkeit, mit welcher die Kristallisation aus übersättigten Lösungen in Ammoniumsulfatlösungen verläuft, und der Gleichgewichtszustand bei dem sie schließlich

stockt (d. h. die Löslichkeit des Eihydrates[1]) oder Eisulfates), sind von den folgenden Bedingungen abhängig:

1. Die Kristallisationsgeschwindigkeit ist um so größer, je größer die Ammoniumsulfatkonzentration und die anfängliche Proteinkonzentration und je höher die Temperatur der Kristallisation ist.

2. Im Gleichgewichtszustand wird — unter sonst gleichen Umständen — der Eihydratgehalt der Mutterlauge um so kleiner sein, je größer die Konzentration des Ammoniumsulfates ist.

Die dem Gleichgewichtszustand des Systems optimale Temperatur, d. i. diejenige Temperatur, bei welcher der

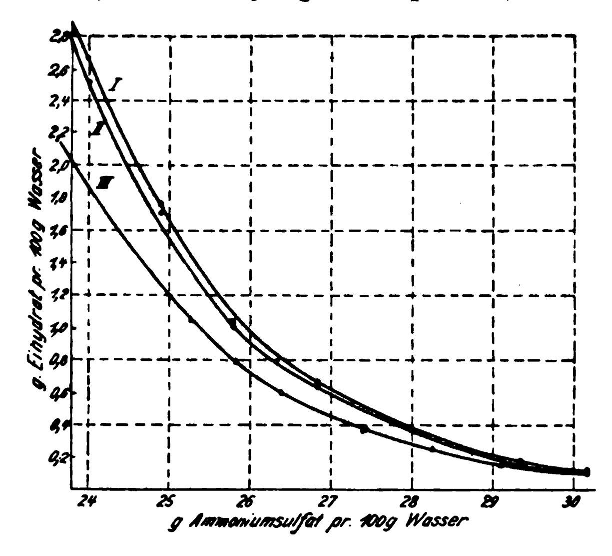


Fig. 16.

Eihydratgehalt der Mutterlauge, alles übrige gleich, am kleinsten ist, liegt zwischen 12 und 29°, wahrscheinlich in der Nähe von 20°. Es ist jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gleichgewichtszuständen des Systems innerhalb der Temperaturgrenzen 12 und 29°, während derjenige bei 0° ein ausgesprochen verschiedener ist, indem die Eihydratkonzentration der Mutterlauge bei 0° um ein Bedeutendes größer ist als bei den höheren Temperaturen.

Die dem Gleichgewichtszustand des Systems optimale Konzentration der Wasserstoffionen, d. i. diejenige Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher unter sonst gleichen Umständen die Eihydratkonzentration der Mutterlauge am schwächsten ist, entspricht dem p_H = etwa 4·58 und

[1]) Mit diesem Wort bezeichnen wir künftig kurzheitshalber den mit 7·86 multiplizierten Proteinstickstoff (100/12·72 = 7·86; siehe S. 604).

scheint von der Ammoniumsulfatkonzentration und der Kristallisationstemperatur unabhängig zu sein.

Die anfängliche Proteinkonzentration ist auf das Gleichgewicht des Systems ohne Einfluß.

Fig. 16 zeigt den Einfluß der Ammoniumsulfatkonzentration sowohl auf die Kristallisationsgeschwindigkeit wie auf die Löslichkeit. Der Eihydratgehalt ist durch die Ordinate und die Ammoniumsulfatkonzentration S (d. h. die Menge $Am_2\,SO_4$, die in 100 g Wasser gelöst ist) durch die Abszisse dargestellt. Kurve *I* gibt die Lage nach viertägiger und Kurve *II* nach 13tägiger Kristallisation aus übersättigten Lösungen, während Kurve *III* die durch Lösung

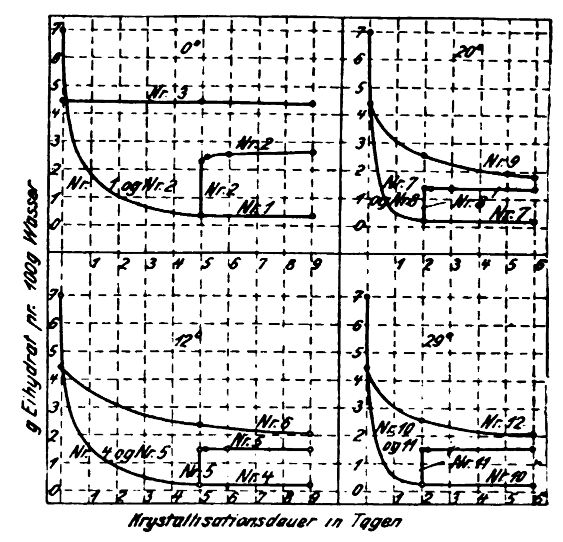


Fig. 17.

der Kristalle hervorgebrachte Gleichgewichtslage zeigt. Die Temperatur ist 18°, und die Wasserstoffionenkonzentration entspricht dem $p_H = 4{\cdot}85$.

Auf Fig. 17 ist der Einfluß der Temperatur durch vier Kurvensysteme versinnlicht, von welchen jedes System die aufgeschriebene Temperatur repräsentiert und wo die Ordinaten den Eihydratgehalt nach dem Verlauf der als Abszisse angegebenen Tage bedeuten. Die Kurven *1*, *4*, *7* und *10* repräsentieren eine Lösung mit 28·233 g $Am_2\,SO_4$ und ursprünglich 6·955 g Eihydrat, die Kurven *3*, *6*, *9* und *12* eine solche mit 24·044 g $Am_2\,SO_4$ und ursprünglich 4·467 g Eihydrat auf 100 g Wasser, während die Kurven *2*, *5*, *8* und *11* die durch angemessene Verdünnung der in Kristallisation begriffenen ersten Reihe Lösungen hervorgebrachte Lösungsgleich-

gewicht der zweiten Reihe darstellen. Die Wasserstoffionenkonzentration entspricht auch hier dem p_H = zirka 4·85.

Auf Fig. 18 ist der Gehalt an Eihydrat als Ordinate und die Wasserstoffionenkonzentration als Abszisse eingeführt. Die Kurven *I*, *II* und *III* zeigen die Lage von Lösungen mit 25·947 *g* Ammoniumsulfat und (ursprünglich) 8·594 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser nach bezw. 2-, 5-, 21tägiger Kristallisation, während die Kurven *IV*, *V* und *VI* Lösungen mit 27·121 *g* Ammoniumsulfat und (ursprünglich) 8·642 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser zu entsprechenden Zeiten darstellen.

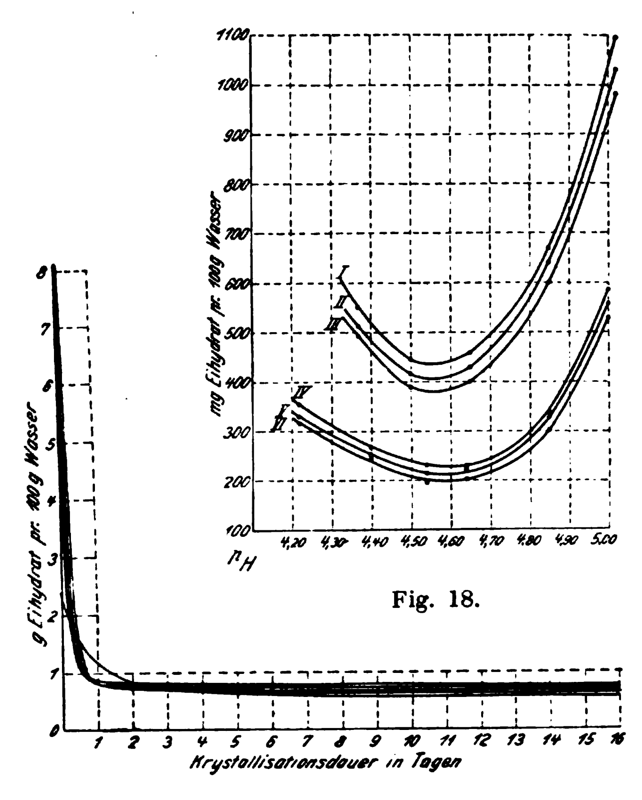


Fig. 18.

Fig. 19.

Wieder auf der Fig. 19 finden wir die Eihydratmenge als Ordinate, während die Kristallisationsdauer als Abszissen fungiert, und die fünf Kurven fünf Lösungen mit verschiedenem ursprünglichem Proteingehalt, aber sonst von identischer Zusammensetzung (p_H = 4·87 — 4·89, S = 26·658) repräsentieren. Der Verlauf der Kurven zeigt sowohl daß die Kristallisationsgeschwindigkeit mit

der ursprüngl.chen Proteinkonzentration wächst als auch daß die Gleichgewichtslage von derselben unabhängig ist, indem die kleine Abweichung zwischen dem Eihydratgehalt beim Gleichgewicht von während der Kristallisation denaturiertem Albumin (siehe unten) herrührt, dessen Menge natürlich mit der ursprünglichen Menge zunimmt.

e) Osmotischer Druck.

D e r o s m o t i s c h e D r u c k des Eihydrates ist in einer Lösung von g e g e b e n e r Zusammensetzung immer derselbe, variiert aber mit der Zusammensetzung des Lösungsmittels. Bezeichnet man den von einem Milligrammäquivalent Proteinstickstoff ausgeübten osmotischen Druck mit π, findet man, daß diese Größe

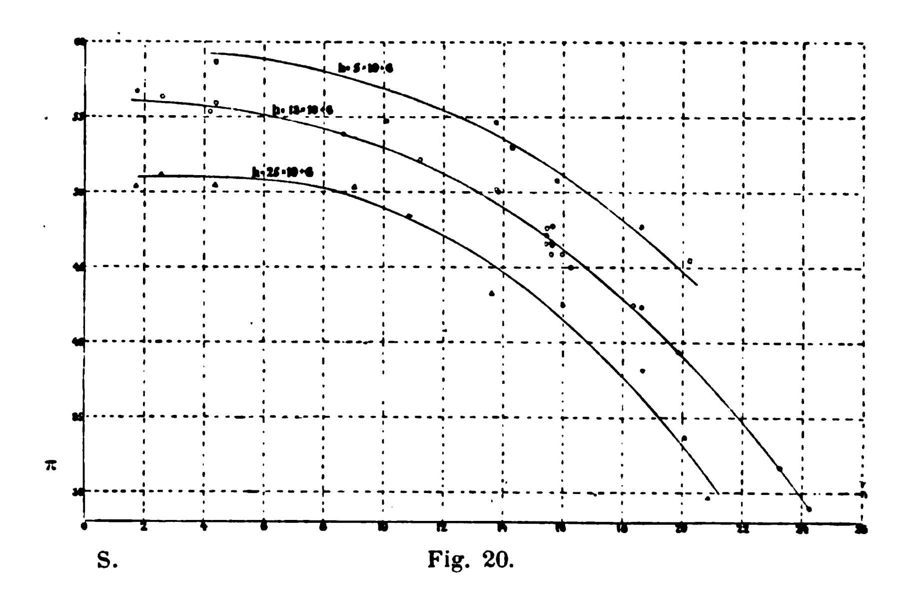


Fig. 20.

mit steigender A m m o n i u m s u l f a t k o n z e n t r a t i o n abnimmt und bei W a s s e r s t o f f i o n e n k o n z e n t r a t i o n e n zwischen 40×10^{-6} und 100×10^{-6} wesentlich konstant ist, um auf beiden Seiten dieser Region zuzunehmen, am stärksten bei den niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen,

während der E i n f l u ß d e r P r o t e i n k o n z e n t r a t i o n je nach der Ammoniumsulfatkonzentration verschieden ausfällt: Bei hoher Ammoniumsulfatkonzentration (15·4 *g* Salz auf 100 *g* Wasser) ist π von der Proteinkonzentration unabhängig, in nahezu ammoniumsulfatfreien Lösungen nimmt π mit wachsender Proteinkonzentration ab, und in Lösungen mit zwischenliegendem Gehalt

an Ammoniumsulfat (4·36 auf 100 *g* Wasser) begegnet man dem entgegengesetzten Verhältnis: π wächst mit der Proteinkonzentration.

Die Fig. 20 und 21, auf welchen π als Ordinate und die Ammoniumsulfatkonzentration S bezw. die Wasserstoffionenkonzentration h als Abszissen verzeichnet sind, zeigen diese Abhängigkeit. Eine in Einzelheiten gehende Erklärung dieser Erscheinungen, die von sehr verwickelter Natur sind, läßt sich aus dem bisher vorliegenden Beobachtungsmaterial nicht geben, und dasselbe soll daher hier nicht mitgenommen werden. Wer sich dafür interessiert, mag es in den Originalabhandlungen suchen. Nur soll hier noch mitgeteilt

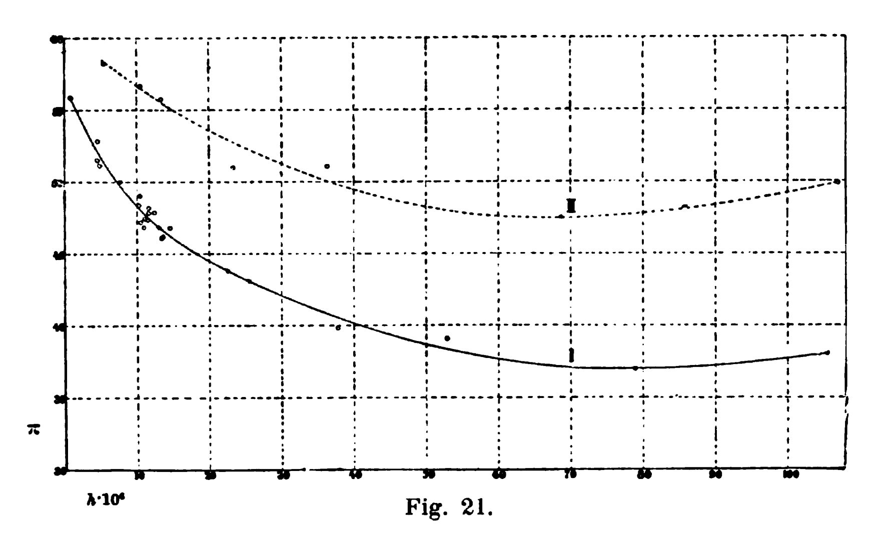


Fig. 21.

werden, daß *S. P. L. Sörensen* meint daraus schließen zu dürfen, daß die Änderungen von π hauptsächlich in einer Assoziation bezw. Dissoziation von Proteinmolekeln mit bestimmter Größe ihre Ursache haben, und daß dieses Proteinmolekel etwa 380 Atomen N besitzt und somit in wasserfreiem Zustand $380 \times 14{\cdot}01 \times 6{\cdot}45 =$ $=$ zirka 34·000 und in wasserhaltigem Zustand $34{\cdot}000 \times 1{\cdot}22 =$ $=$ zirka 42·000 wiegt.

f) Säurebindungsvermögen.

Wie schon mehrmals hervorgehoben, wechseln die Eigenschaften der ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösungen mit der Wasserstoffionenkonzentration derselben. Diese Größe ist indessen nicht nur eine Funktion der gegenwärtigen Menge überschüssiger Säure und der Ammoniumsulfatkonzentration (unter Überschuß von Säure oder überschüssiger Säure wird hier und im folgenden immer diejenige Menge verstanden, welche über die mit dem gegenwärtigen Ammoniak äquivalente

Menge hinaus vorhanden ist), sondern hängt auch davon ab, wieviel Säure das anwesende Albumin bindet. Die von einem Grammäquivalente Proteinstickstoff gebundene „überschüssige“ Säuremenge bezeichnen wir als das Säurebindungsvermögen des Eieralbumins und diese Größe läßt sich unter gewissen Voraussetzungen berechnen, wenn man die Wasserstoffionenkonzentration, von Lösungen bekannter Zusammensetzung mißt (siehe unten).

Solche Messungen haben ergeben:

1. daß Eieralbuminlösungen, nach dem später mitgeteilten Verfahren dargestellt, unter identischen Bedingungen immer dasselbe Säurebindungsvermögen zeigen;

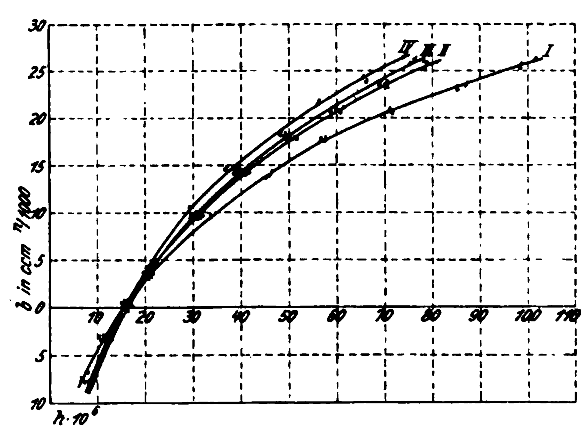


Fig. 22.

2. daß das Säurebindungsvermögen bei einer Wasserstoffionenkonzentration gleich dem isoelektrischen Punkt *O* ist, bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen positiv und mit denselben wachsend, bei niedrigeren dagegen negativ, d. h. es wird Ammoniak (Base) gebunden, und zwar um so mehr je kleiner die Wasserstoffionenkonzentration wird;

3. daß dieses Vermögen mit der Ammoniumsulfatkonzentration wächst und

4. bei Wasserstoffionenkonzentrationen in einiger Entfernung von dem isoelektrischen Punkt von der Proteinkonzentration unabhängig ist, während es in der Nähe des isoelektrischen Punktes einen um so größeren numerischen Wert besitzt, je kleiner die Proteinkonzentration ist.

Dieses Verhalten steht ganz damit im Einklang, was für das Säurebindungsvermögen einfach zusammengesetzter Ampholyten Gültigkeit hat[1]).

Die Kurven *I*, *II*, *III* und *IV* der Fig. 22 stellen Systeme mit verschiedener Ammoniumsulfatkonzentration dar, *I* mit zirka 0·4, *II* zirka 2·4, *III* zirka 10·0 und *IV* zirka 20·5 *g* Ammoniumsulfat in 100 *g* Wasser. Das Säurebindungsvermögen *b*, die von einem Milligrammäquivalente Proteinstickstoff gebundene cm^3 n/1000-Schwefelsäure, ist als Ordinate, die Wasserstoffionenkonzentration als Abszisse aufgezeichnet. Ein negativer Wert des Säurebindungsvermögens heißt, daß Ammoniak (Base) statt Säure gebunden wird.

B. Analytische Methoden.

a) Zusammensetzung der Kristalle.

Die aus ammoniumsulfathaltiger Lösung ausgeschiedenen Kristalle von Eisulfat lassen sich in reinem, von der Mutterlauge oder dem Lösungsmittel befreitem, trockenem Zustand nicht darstellen und ihre Zusammensetzung kann deshalb nicht durch unmittelbare Analyse ermittelt werden.

Wenn man indessen eine Eieralbuminlösung mit Ammoniumsulfat fällt, den auskristallisierten Niederschlag nach dem Verlauf einiger Tage abfiltriert und abgewogene Teile sowohl vom Filtrat als auch von dem Niederschlag mit anhängender Mutterlauge analysiert, dann kann man aus den Analysenresultaten gewisse Schlußsätze, die Zusammensetzung des Niederschlages betreffend, ziehen, indem man von der Voraussetzung ausgeht, daß die den Niederschlag umgebende Mutterlauge und das Filtrat beide dieselbe Zusammensetzung besitzen[2]) und daß für die Kristalle und den noch in Lösung befindlichen Stoff dasselbe gilt.

Findet man nämlich, daß das Verhältnis zwischen den Gewichten des Ammoniaks und des Wassers für das Filtrat und für die Kristalle mit anhaftender Mutterlauge dasselbe ist, dann kann der Schlußsatz gezogen werden, daß entweder die Kristalle kein Wasser und kein Ammoniak enthalten, oder sie enthalten die beiden im selbigen Verhältnis, wie sie in der Mutterlauge vorhanden sind. Ergeben dagegen die Analysen, daß das Ammoniak im Filtrat

---

[1]) Siehe hierüber Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** 93 ff. (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 133 ff. (1919).

[2]) Damit diese Voraussetzung stichhaltig sein kann, muß man bei der praktischen Ausführung eines solchen Versuches gewisse Vorsichtsmaßregeln innehalten; so z. B. muß man die Filtrierung solchermaßen einrichten, daß Verdampfung von Wasser ausgeschlossen ist, und den zuerst durchlaufenden Teil des Filtrates wegwerfen, weil dieser, der Adsorptionsfähigkeit des Filtrierpapiers wegen, eine andere Zusammensetzung als der Hauptteil haben kann.

in einem anderen Verhältnis zum Wasser steht als in den Kristallen mit umgebender Mutterlauge, und zwar z. B. so, daß der Niederschlag mit Mutterlauge für eine gegebene Menge Ammoniak mehr Wasser das als Filtrat enthält, dann wird das bedeuten, daß die Kristalle Wasser und eventuell Schwefelsäure enthalten. Außer diesem Überschuß an Wasser und Schwefelsäure können die Kristalle auch in diesem Falle Ammoniumsulfat und Wasser in demselben Verhältnis enthalten, in welchem diese beiden Stoffe im Filtrat auftreten, worüber später.

Bezeichnet man den Inhalt von

Ammoniakstickstoff in 100 g Filtrat mit a_f,
" " 100 " Niederschlag mit a_b,
Proteinstickstoff " 100 " Filtrat mit p_f,
" " 100 " Niederschlag p_b

und nennt man den Faktor, mit welchem man den Proteinstickstoff zu multiplizieren hat, um das Gewicht von kristallisierbarem Eieralbumin, „Eisulfat“, zu bekommen, x, dann wird 100 g Filtrat aus

$a_f \,.\, 4{\cdot}7163$ g Ammoniumsulfat[1]),
$p_f \,.\, x$ " Eisulfat und
$(100 \div a_f \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_f \,.\, x)$ " Wasser

bestehen.

100 g Niederschlag (mit anhaftender Mutterlauge) wird in Analogie hiermit

$a_b \,.\, 4{\cdot}7163$ g Ammoniumsulfat,
$p_b \,.\, x$ " Eisulfat und
$(100 \div a_b \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_b \,.\, x)$ " Wasser

enthalten.

Mit Bezug auf das Proportionalitätsprinzip muß man jetzt haben:

$$\frac{a_f \,.\, 4{\cdot}7163}{100 \div a_f \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_f \,.\, x} = \frac{a_b \,.\, 4{\cdot}7163}{100 \div a_b \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_b \,.\, x}$$

woraus man erhält

$$x = \frac{100\,(a_f \div a_b)}{a_f \,.\, p_b \div a_b \,.\, p_f} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad 1).$$

Die Formel 1) ist berechnet, und hat somit nur Gültigkeit unter der Voraussetzung, daß das auskristallisierte Eisulfat nur

[1]) 4·7163 ist derjenige Faktor, mit welchem der Ammoniakstickstoff zu multiplizieren ist, um das entsprechende Gewicht an Ammoniumsulfat zu geben.

Wasser (und Schwefelsäure), aber kein Ammoniak enthält. Wir werden jetzt die Sachlage für den Fall untersuchen, daß das auskristallisierte Eisulfat auch noch Ammoniumsulfat und Wasser in demselben Verhältnis wie die Mutterlauge enthält.

Wir benützen dieselben Bezeichnungen wie oben, so daß x denjenigen Faktor bezeichnet, mit welchem der Proteinstickstoff multipliziert werden muß, um das Gewicht des auskristallisierten Eisulfates minus das in demselben eingehende Ammoniumsulfat zu geben; y ist der Faktor, welcher durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes das Gewicht des in das Eisulfat eingetretenen Ammoniumsulfates gibt, und z bedeutet den Faktor, womit der Proteinstickstoff zu multiplizieren ist, wenn man das gesamte Gewicht des kristallisierten Eisulfates zu kennen wünscht. Man hat also:

$$z = x + y \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad 2).$$

100 g Filtrat enthalten demnach

$(a_f \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_f \,.\, y)$ g Ammoniumsulfat,
$p_f \,.\, z$ „ Eisulfat (wasserhaltiges und ammoniumsulfathaltiges) und
$(100 \div a_f \,.\, 4{\cdot}7163 + p_f \,.\, y \div p_f \,.\, z)$ „ Wasser.

100 g Niederschlag (mit anhaftender Mutterlauge) enthalten

$(a_b \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_b \,.\, y)$ g Ammoniumsulfat,
$p_b \,.\, z$ „ Eihydrat (wasserhaltiges und ammoniumsulfathaltiges) und
$100 \div a_b \,.\, 4{\cdot}7163 + p_b \,.\, y \div p_b \,.\, z)$ „ Wasser.

Zufolge des Proportionalitätsprinzips muß jetzt

$$\frac{a_f \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_f \,.\, y}{100 \div a_f \,.\, 4{\cdot}7163 + p_f \,.\, y \div p_f \,.\, z} = \frac{a_b \,.\, 4{\cdot}7163 \div p_b \,.\, y}{100 \div a_b \,.\, 4{\cdot}7163 + p_b \,.\, y \div p_b \,.\, z}$$

welche Gleichung durch eine einfache Rechnung die folgende gibt:

$$z = \frac{100\,(a_f \div a_b)}{a_f \,.\, p_b \div a_b \,.\, p_f} + y\,\frac{100\,(p_b \div p_f)}{4{\cdot}7163\,(a_f \,.\, p_b \div a_b \,.\, p_f)}$$

Die Gleichung 3) hat demnach die Form

$$z = r \div s \,.\, y \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad 4)$$

wo die Werte der Koeffizienten r und s aus der Gleichung 3) hervorgehen.

Gleichung 4) ist, weil mit zwei Unbekannten, unbestimmt, und jeder willkürliche Wert des y gibt einen entsprechenden Wert



des z; wird y gleich Null gesetzt, fallen die Gleichungen 3) und 4) mit 1) zusammen, derart, daß man in diesem Falle $z = r = x$ bekommt, was auch zu erwarten war.

Da die Analysenresultate eines einzelnen Versuches nur die Berechnung der Koeffizienten r und s erlauben, so ist es nicht möglich durch einen Versuch die beiden Unbekannten z und y der Gleichung 4), d. h. den Gehalt der Kristallen an Nichteiweiß, zu bestimmen.

Ehe wir weitergehen, werden wir indessen die Größen r und s, die wir immer bestimmen können, etwas näher betrachten. Wir haben:

$$r = \frac{100\,(a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f};\ s = \frac{100\,(p_b \div p_f)}{4{\cdot}7163\,(a_f \cdot p_f \div a_b \cdot p_f)}.$$

Mit Bezug auf den Nenner dieser Koeffizienten wird a_f immer größer als a_b sein, und da p_f immer im Verhältnis zu p_b sehr klein sein wird, so kann man das Glied $a_b \cdot p_f$ sehr häufig ganz vernachlässigen. Jedenfalls ist die Größe des Nenners so gut als ausschließlich durch das Glied $a_f \cdot p_b$ bestimmt. Der Koeffizient r kann demnach in reduzierter, aber annähernd richtiger Form folgendermaßen geschrieben werden:

$$r = \frac{100\,(a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b} = \frac{100}{p_b}\left(1 \div \frac{a_b}{a_f}\right).$$

Aus der in dieser Weise geschriebenen Formel ersieht man, daß ein Fehler in der Bestimmung von p_b mit seinem ganzen Gewicht, aber auch nicht mit mehr, wirken wird und daß demgemäß ein solcher Fehler von 1% dem Werte von r einen Fehler von ebenfalls 1% beibringen wird.

Was a_b und a_f betrifft, ersieht man, daß, wenn die prozentischen Fehler dieser beiden Größen gleich groß und gleichgerichtet sind, sie sich gegenseitig aufheben. Ist dagegen die eine, aber nicht die andere, dieser Größen mit einem Fehler behaftet, dann wird die Wirkung desselben in Abhängigkeit der Größe $\frac{a_b}{a_f}$ vervielfältigt. Ist z. B. diese Größe gleich zirka 0·8, was oft vorkommen kann, dann ersieht man leicht, daß ein Fehler von 1‰ im Werte des a_b (nicht aber in dem des a_f) eine viermal so große Änderung der Differenz $\left(1 \div \frac{a_b}{a_f}\right)$, welche ja ungefähr gleich 0·2 wird, hervorbringen und deshalb den Wert des r mit einem Fehler von 4‰ belasten muß. Man muß sich es deshalb sehr angelegen sein lassen,

darüber genau zu wachen, daß die Ammoniakbestimmungen im Niederschlag und im Filtrat zur gleichen Zeit und in ganz gleicher Weise ausgeführt werden, damit man rechnen darf, daß die möglichen Fehlerquellen einen gleichgroßen Einfluß auf beide geübt haben.

Wenn man im Nenner des Koeffizienten s das Glied $a_b . p_f$ und im Zähler das Glied p_f, welches p_b gegenüber verschwindend klein ist, wegwirft, dann kann man schreiben:

$$s = \frac{100 . p_b}{4 \cdot 7163 . a_f . p_b} = \frac{100}{4 \cdot 7163 . a_f}$$

und man ersieht, daß s nur von a_f abhängig ist.

Da nun $4 \cdot 7163 . a_f$ ein Ausdruck für die in 100 g des Filtrates vorhandene Menge Ammoniumsulfat ist, wird demzufolge s der Faktor sein, mit welchem das Gewicht des Ammoniumsulfates zu multiplizieren ist, um das Gewicht des entsprechenden Filtrates zu geben.

Da weiter y der Faktor ist, womit man den Proteinstickstoff multiplizieren muß, um die Menge des im entsprechenden Eisulfat eingetretenen Ammoniumsulfates zu erhalten, so ist $s . y$ derjenige Faktor, welcher, mit dem Proteinstickstoff multipliziert, die in der demselben entsprechenden Menge Eisulfates enthaltene Filtratmenge gibt. Man sieht somit, daß die rechte Seite der Gleichung

$$z = r + s . y,$$

rein formell betrachtet, aus zwei Gliedern besteht, von welchen das erstere, r, wenn der Proteinstickstoff damit multipliziert wird, das Gewicht des kristallisierten Eieralbumins minus dem darin eingehenden Filtrat gibt, während das letztere, $s . y$, wie oben auseinandergesetzt, denjenigen Faktor darstellt, mittels dessen man durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes das Gewicht des im Eisulfat eingetretenen Filtrates erhält. Wir haben bei diesen Betrachtungen über s die für $p_f = 0$ geltende Formel benützt; es ist aber leicht einzusehen, daß auch, wenn p_f von meßbarer Größe ist, a_f so lange den alles überwiegenden Einfluß auf den Wert von s behält, als p_f, mit p_b verglichen, klein ist. Die von dem Grenzfall $p_f = 0$ abgeleiteten Überlegungen haben dann auch in solchen Fällen Gültigkeit.

Um jetzt wenigstens einen Begriff von y zu erhalten, mit anderen Worten, um über den möglichen Gehalt der Kristalle an Ammoniumsulfat Aufklärung zu bekommen, können wir den folgenden Weg einschlagen:

Erinnert man sich, daß die Proportionalitätsmethode (wie die hier angewandte analytische Methode genannt worden ist)



Tabelle 1.

Übersicht über die Größe des Faktors *r*, wie er

Nr. des Versuches	Tag des Versuches	Temperatur des Versuches	Dauer der Kristallisation Tage	Bemerkung
1	April 1913	5°	2	Variation der Versuchstemperatur und der Kristallisationsdauer.
2	„	18°	2	
3	„	11°	12	
4	„	24°	4	
5	Okt. 1913	4°	3	
6	„	24°	3	
7	Nov. 1913	18°	10	Es wurde beim Versuche eine aus älteren Eiern dargestellte Probe Eieralbumin angewendet, welche übrigens gut, aber sehr langsam kristallisierte.
8	„	19°.	11	„Schnell" — Diese beiden Versuche wurden gleichzeitig und ganz gleich behandelt, nur wurde beim ersten die ganze Menge Ammoniumsulfat auf einmal zugegeben, so daß die Kristallisation sehr schnell vor sich ging. Beim zweiten wurde das Ammoniumsulfat nach und nach zugegeben, derart, daß die Kristallisation sich nur langsam vollstreckte.
9	„	19°	11	„Langsam"
10	Mai 1914	19°	5	Beim ersten dieser drei Versuche war die Ammoniumsulfatmenge so geringfügig, daß nur ein kleiner Teil des Eieralbumins auskristallisierte. Das Filtrat vom ersten Versuch wurde zum zweiten Versuch benützt, indem mehr Ammoniumsulfat zugefügt wurde, und das Filtrat von diesem in derselben Weise zum dritten Versuch. Durch eine solche fraktionierte Kristallisation könnte ein eventueller Unterschied im Dispersitätsgrad des Eieralbumins möglicherweise zum Vorschein kommten.
11	„	19°	+ weiter 5	
12	„	19°	+ weiter 5	
13	April 1915	19°	9	Während die Wasserstoffionenkonzentration beim ersten dieser Versuche ungefähr die für diese Auskristallisationen normale war, so war sie im zweiten Versuch weit größer als üblich, indem das Filtrat $p_{H^{\cdot}} = 4{\cdot}417$; $h = 38{\cdot}28 \,.\, 10^{\div 6}$ zeigte. (Siehe übrigens S. 651, Anm. 1.)
14	„	19°	9	

Tabelle 1.

sich mittels der Formel $r = \frac{100\ (a_f \div a_b)}{a_f\ .\ p_b \div a_b\ .\ p_f}$ berechnet.

100 g Filtrat enthielten		100 g Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge enthielten			r	Mittel von r
Ammoniak-N in g (a_f)	Protein-N in g (p_f)	Marke der Probe	Ammoniak-N in g (a_b)	Protein-N in g (p_b)		
4·7000	0·0228	I	3·8960	2·1871	$7\cdot89_0$	$7\cdot87_9$
		II	3·8520	2·3045	$7\cdot89_3$	
		III	3·9220	2·1267	$7\cdot85_4$	
4·6870	0·0316	I	4·1050	1·6332	$7\cdot73_4$	$7\cdot81_6$
		II	4·0330	1·7983	$7\cdot87_8$	
		III	4·1400	1·5170	$7\cdot83_7$	
4·8321	0·0151	I	4·1574	1·7978	$7\cdot82_3$	$7\cdot79_1$
		II	4·2147	1·6581	$7\cdot76_8$	
		III	4·2982	1·4332	$7\cdot78_2$	
4·8270	0·0161	I	3·9990	2·1870	$7\cdot89_1$	$7\cdot90_1$
		II	4·0300	2·0980	$7\cdot92_0$	
		III	4·0610	2·0240	$7\cdot89_3$	
4·6460	0·0562	I	4·0910	1·5940	$7\cdot73_4$	$7\cdot83_1$
		II	4·0210	1·7480	$7\cdot91_6$	
		III	4·0580	1·6630	$7\cdot84_2$	
4·6550	0·0343	I	3·7600	2·4700	$7\cdot87_2$	$7\cdot84_1$
		II	3·7620	2·4670	$7\cdot86_4$	
		III	3·8050	2·3730	$7\cdot78_7$	
4·7648	0·0377	I	3·6791	2·9043	$7\cdot92_4$	$7\cdot90_2$
		II	3·7155	2·8381	$7\cdot84_0$	
		III	3·6872	2·8763	$7\cdot94_3$	
4·6966	0·0235	I	3·7563	2·5834	$7\cdot80_7$	$7\cdot85_5$
		II	3·7042	2·6802	$7\cdot93_9$	
		III	3·7300	2·6508	$7\cdot81_9$	
4·6868	0·0344	I	3·5429	3·0945	$7\cdot95_4$	$7\cdot94_5$
		II	3·5465	3·0965	$7\cdot92_3$	
		III	3·5481	3·0791	$7\cdot95_7$	
4·0037	0·4036	I	3·0827	3·2368	$7\cdot86_2$	$7\cdot86_1$
		II	3·0906	3·2056	$7\cdot88_0$	
		III	3·0683	3·2886	$7\cdot84_2$	
4·4191	0·1100	I	3·1788	3·6617	$7\cdot83_4$	$7\cdot83_6$
		II	3·2784	3·3710	$7\cdot84_7$	
		III	3·2062	3·5855	$7\cdot82_9$	
5·4181	0·0040	I	4·6834	1·7372	$7\cdot82_1$	$7\cdot81_0$
		II	4·5686	2·0139	$7\cdot79_8$	
4·3644	0·1240	I	3·2179	3·4069	$7\cdot92_3$	$7\cdot91_8$
		II	3·2120	3·4242	$7\cdot92_2$	
		III	3·2236	3·3961	$7\cdot91_0$	
4·3942	0·0551	I	3·4264	2·7959	$8\cdot00_0$	$7\cdot96_8$
		II	3·4769	2·6641	$7\cdot96_7$	
		III	3·3910	2·9184	$7\cdot93_8$	
		Mittel der ersten 12 Werte:				**7·86**

auf einer Differenzbestimmung eines bestimmten Stoffes (hier des Ammoniakstickstoffes) im Filtrat und im Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge fußt, so leuchtet es unmittelbar ein, daß ein eventueller Gehalt an Ammoniumsulfat als integrierender Bestandteil der Kristalle eine um so größere Rolle spielen wird, je kleiner die Ammoniumsulfatkonzentration des Filtrates ist. Anders gesagt: Man wird — der angewandten Methode wegen — in zwei Versuchen mit verschiedener Konzentration des Ammoniumsulfates für r nicht denselben, aber einen um so kleineren Wert finden, je kleiner diese Konzentration ist, und dieser Unterschied wird desto stärker hervortreten, je mehr Ammoniumsulfat die Kristalle enthalten.

Dasselbe Resultat erhält man durch Betrachtung der obigen angenäherten Formel für r:

$$r = \frac{100}{p_b}\left(1 \div \frac{a_b}{a_f}\right).$$

Wenn der Ammoniakstickstoff, a_b, nicht lediglich von der anhaftenden Mutterlauge herrührt, sondern ein Teil davon, a_k, ein Bestandteil der Kristalle ist, während der Rest, a_m, der anhaftenden Mutterlauge gehört und deshalb unter sonst gleichen Umständen (gleicher Wert von p_b) in einem bestimmten Verhältnis zu a_f steht, so wird man die Gleichung als

$$r = \frac{100}{p_b}\left(1 \div \frac{a_m}{a_f} \div \frac{a_k}{a_f}\right)$$

schreiben können.

Wenn jetzt $\frac{a_m}{a_f}$ für einen bestimmten Wert von p_b konstant ist, so sieht man leicht, daß die Formel einen um so kleineren Wert für r gibt, je kleiner a_f (der Gehalt des Filtrates an Ammoniumsulfat) und je größer a_k (die in den Kristallen enthaltene Menge Ammoniumsulfat) ist.

Eine Durchsicht der Tabelle Seite 616, in welcher die Ergebnisse der Analysen von unter verschiedenen Bedingungen gebildeten Kristallen gesammelt sind, wird zeigen, daß r ebensowenig von der Ammoniumsalzkonzentration wie von den übrigen Umständen abhängig ist, und wenn auch dieses kaum für einen exakten Beweis angesehen werden kann, so ist es doch wohl, bis das Entgegengesetzte wahrscheinlich gemacht wird, berechtigt den Schluß zu ziehen, daß die Kristalle Ammoniumsulfat nicht oder nur in Spuren enthalten; und dieser Schluß ist um so berechtigter, als er auch durch anderweitige Versuche und Betrachtungen, auf die hier einzugehen zu weit führen würde, gestützt wird.

Durch Multiplikation des Proteinstickstoffes mit dem Faktor $r = x = 7{\cdot}86$ erhält man demnach das Gewicht der entsprechenden Menge kristallisierten Albuminsulfates.

Der Faktor dagegen, mit welchem man den Proteinstickstoff multiplizieren muß, um das Gewicht des Eieralbumins an sich zu bekommen, ist durch Eintrocknen von Albuminlösungen mit bekannter Zusammensetzung in folgender Weise ermittelt worden:

In eine Reihe von gewogenen, breiten Wägegläsern mit eingeschliffenem Stöpsel wurden 10 oder 20 cm^3 einer Eieralbuminlösung abgemessen und gewogen, welche Lösung 0·7825 *g* Proteinstickstoff und 0·099 *g* Ammoniumsulfat in 100 *g* enthielt. Einige dieser Proben wurden ohne jegliche Vorbehandlung eingetrocknet, andere wurden zuerst fünf Stunden in einen Brutkasten bei 55 bis 60° gestellt, wodurch eine teilweise Koagulation stattfand, während der Rest der Proben vor dem Eintrocknen drei viertel Stunden bei 93 bis 97° gestellt wurde, was die ganze Masse in ein steifes Gele verwandelte. Das Eintrocknen geschah im Vakuum über festem Kaliumhydroxyd bei Zimmertemperatur und wurde einige Monate hindurch fortgesetzt, bis der Gewichtsverlust während eines Monates weniger als 1 *mg* betrug. Die Versuchsresultate sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Es erhellt aus den sieben ersten senkrechten Stäben der Tabelle, welche keine weitere Erklärung nötig haben, daß der gesuchte Faktor sehr nahe 6·4 ist, indem die Mittelzahl aller Bestimmungen $6{\cdot}39_2$ ist. Die Vorbehandlung der Lösung scheint keinen nachweisbaren Einfluß auf die Größe des Faktors geübt zu haben, indem die gegenseitigen Abweichungen der einzelnen Versuche sehr wohl von Versuchsfehlern her stammen können.

Um sich zu vergewissern, daß das Albumin durch das Eintrocknen übrigens unverändert bleibt, wurden von den eingetrockneten und gewogenen Proben einige benützt, um zu bestimmen, wieviel löslichen Proteinstickstoff der Eintrocknungsrest enthielt, während ein wässeriger Auszug anderer Proben zu Kristallisationsversuchen gebraucht wurde, um dadurch Aufklärung darüber zu erhalten, inwieweit das Eieralbumin durch die Vorbehandlung und die nachfolgende Eintrocknung einige Veränderungen erlitten habe.

Der vorletzte senkrechte Stab der Tabelle 2 zeigt, daß in den Proben Nr. 2 und 3 bis 90% des Proteinstickstoffes noch in löslicher Form vorhanden sind. Die Eintrocknung bei Zimmertemperatur ohne Vorbehandlung hat somit nur eine geringfügige Denaturierung zur Folge gehabt. Weit mehr des Albumins ist durch die Vorbehandlung bei 55 bis 60° (Nr. 6 und 7) denaturiert worden, und die Vorbehandlung bei 93 bis 97° hat eine vollständige Denaturierung bewirkt.

Tabelle 2.

Eintrocknen von Eieralbuminlösung.

(100 *g* Eieralbuminlösung enthielten 0·7825 *g* Proteinstickstoff und 0·099 *g* Ammoniumsulfat.)

Versuchsnummer	Vorbehandlung	Die abgewogene Eieralbuminlösung		100 *g* Eieralbuminlösung enthalten deshalb		Faktor: Eieralbumintrockensubstanz mit Eieralbuminstickstoff dividiert	Die 100 *g* Eieralbuminlösung entsprechende Menge Trockensubstanz enthielt von löslichem Proteinstickstoff		Bemerkung
		wog *g*	enthielt Trockensubstanz *g*	Trockensubstanz *g*	Eieralbum.-Trockensubstanz (Trockensubstanz ÷ 0·099 *g*) *g*		in *g*	in Prozent der ursprüngl. Menge löslichen Proteinstickstoffes	
1	Keine	20·236	1·0303	5·091	4·992	$6{\cdot}38_0$	—	—	Angewandt z. Kristallis.
2	„	20·252	1·0306	5·089	4·992	$6{\cdot}37_7$	0·7032	89·87	
3	„	10·096	0·5147	5·098	4·999	$6{\cdot}38_9$	0·6925	88·59	
4	„	10·101	0·5142	5·091	4·992	$6{\cdot}38_0$	—	—	
5	5 Stunden bei 55—60°	20·268	1·0346	5·105	5·006	$6{\cdot}39_7$	—	—	„
6	„	20·264	1·0342	5·104	5·005	$6{\cdot}39_6$	0·5863	74·93	
7	„	10·144	0·5190	5·116	5·017	$6{\cdot}41_2$	0·5144	65·74	
8	„	10·142	0·5184	5·11[illegible]	5·012	$6{\cdot}40_5$	—	—	
9	³/₄ Stunden bei 93—97°	20·085	1·0255	5·106	5·007	$6{\cdot}39_8$	—	—	„
10	„	20·121	1·0248	5·093	4·994	$6{\cdot}38_2$	—	0·00	
11	„	10·092	0·5146	5·099	5·000	$6{\cdot}39_0$	—	0·00	
12	„	10·095	0·5151	5·103	5·004	$6{\cdot}39_8$	—	—	
					Mittel...	6·39			

Ein damit völlig im Einklang stehendes Resultat gaben die Kristallisationsversuche, bei welchen der betreffende Eintrocknungsrückstand mit 20 *cm*³ Wasser sorgfältig behandelt wurde; die abfiltrierte Lösung wurde mit so viel gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, daß ein bleibender Niederschlag eben entstand, wonach die Flüssigkeit wieder filtriert und das Filtrat geimpft und nach gutem Umrühren zu Kristallisation beiseite gestellt wurde.

Während die Lösung des Eintrocknungsrückstandes vom Versuch Nr. 9, wie es zu erwarten war, durch Zusatz von Ammoniumsulfat keinen Niederschlag gab, so fingen die den Versuchen Nr. 1 und 5 entsprechenden Lösungen bald zu kristallisieren an, und der gebildete Niederschlag hatte unter dem Mikroskop das gewöhnliche charakteristische Aussehen: Kleine zu Bündeln und Garben vereinigte Nadeln. Nach viertägiger Kristallisation wurde filtriert und das Filtrat analysiert. Es zeigte sich dann, daß die den Versuchen Nr. 1 und 5 entsprechenden Filtrate auf 100 *g* Wasser bezw. 0·430 und 0·578 *g* Eihydrat enthielten, während durch Benützung der oben mitgeteilten Kurven geschätzt werden konnte, daß reine Eieralbuminlösungen durch Kristallisation unter den vorliegenden Umständen (Ammoniumsulfat- und Wasserstoffionenkonzentration) Filtrate mit bezw. zirka 0·270 und 0·240 *g* Eihydrat auf 100 *g* Wasser geben würden. Wenn auch demgemäß — wie eine einfache Rechnung lehrt — weit der größte Teil des Eieralbumins auskristallisiert ist sowohl in Nr. 1 als auch in Nr. 5, so enthält doch in beiden Fällen das Filtrat mehr Eihydrat als normal und es ist unverkennbar, daß die Kristallisationen in Nr. 1 vollständiger als in Nr. 5 gewesen ist.

Das Ergebnis dieser Kristallisationsversuche konnte andeuten, daß vor der Denaturierung des Eieralbumins eine Umbildung in nicht kristallisierbares Eieralbumin stattfindet, das Versuchsmaterial ist aber zu klein, um sichere Folgerungen zu erlauben.

Das Ergebnis dieser Eintrocknungsversuche läßt sich demnach folgendermaßen ausdrücken: Derjenige Faktor, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffes zu multiplizieren ist, um das Gewicht des über festem Kaliumhydroxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrockneten Eieralbumins zu geben, ist sehr nahe 6·4, und dies gilt nicht nur für das lösliche kristallisierbare Eieralbumin, sondern auch für das denaturierte sowie für eventuelle Zwischenglieder zwischen diesen beiden Stoffen.

Mit Benützung des Faktors 6·40 nebst dem oben (S. 617) für kristallisiertes Eieralbumin gefundenen Faktor, 7·86, findet

man den Wasser- und Schwefelsäuregehalt der Kristalle pro 1 *g* wasserfreies Eieralbumin von folgender Größe:

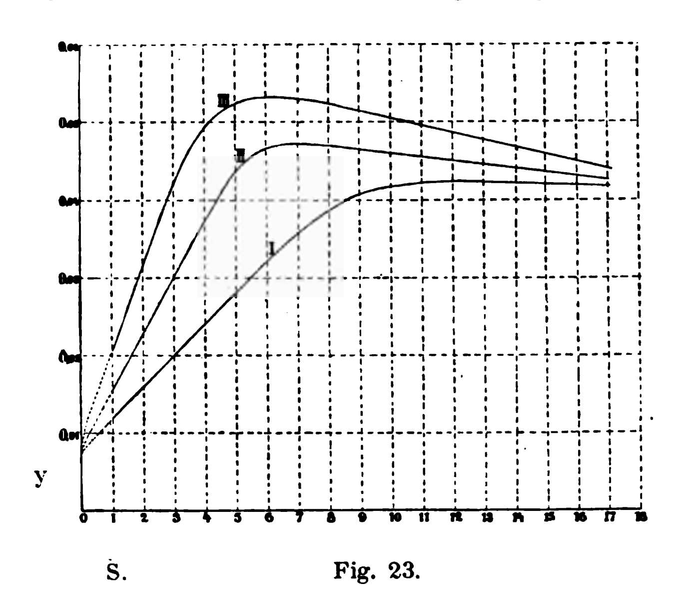
$$\frac{7{\cdot}86 \div 6{\cdot}40}{6{\cdot}40} = 0{\cdot}228\ g.$$

D a s k r i s t a l l i s i e r t e E i e r a l b u m i n e n t h ä l t a l s o a u f j e d e s G r a m m w a s s e r f r e i e s A l b u m i n z i r k a 0·23 *g* W a s s e r u n d S c h w e f e l s ä u r e.

Wir haben jetzt gelernt, wie wir den Gesamtgehalt der Eiweißkristalle an Wasser und Schwefelsäure ermitteln können. Die Bestimmung des Schwefelsäuregehaltes der Kristallen für sich hängt mit der Bestimmung des Säurebindungsvermögens des gelösten Eiweiß eng zusammen, und beide werden deshalb zweckmäßig später zusammen beschrieben.

b) Zusammensetzung des gelösten Eiweiß.

Die „Proportionalitätsmethode“ erlaubt es indessen auch einige Fragen nach der Zusammensetzung des g e l ö s t e n Eiweiß



S. Fig. 23.

zu beantworten. Dann verfahrt man folgendermaßen: Man stellt sich in der später zu beschreibenden Weise ein semipermeables Kollodiumhäutchen dar, welches für das Eihydrat undurchlässig, während es für die übrigen Bestandteile der Lösung völlig durchdringlich ist. Danach macht man sich eine Lösung von Eihydrat

mit genau bekannter Zusammensetzung und bringt diese Lösung in das Häutchen als „Innenflüssigkeit" an, wonächst man das Häutchen in eine andere Portion des Lösungsmittels als „Außenflüssigkeit" stellt und abwartet, bis „Diffusionsgleichgewicht" sich zwischen den zwei Flüssigkeiten eingestellt hat. Dann spielt bei der Proportionalitätsanalyse die Innenflüssigkeit die Rolle des „Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge", indem das Eihydrat der „Niederschlag" und das Dispersionsmittel „die anhaftende Mutterlauge" repräsentiert, während die „Außenflüssigkeit" in die Stelle des „Filtrates" tritt. Analysen dieser Art haben gezeigt, daß die Faktoren r, x, y und z, wenn ihnen für die disperse

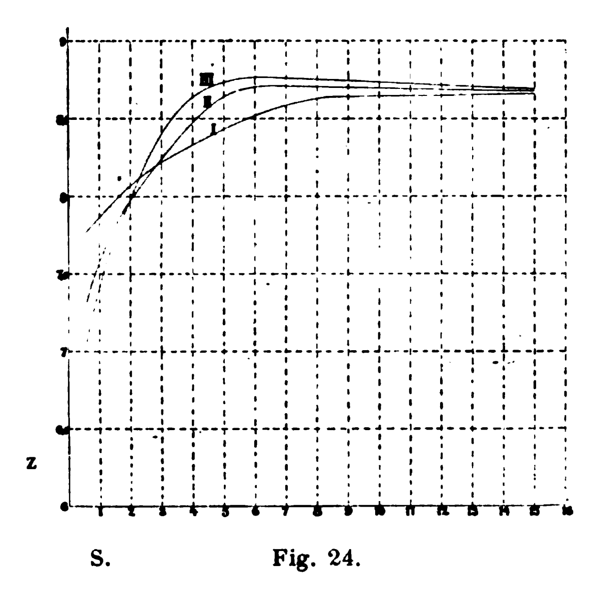


Fig. 24.

Phase eine der oben für die Kristallen angegebenen analoge Bedeutung beigelegt wird, sich mit der Zusammensetzung des Lösungsmittels, sowohl der Salz- wie der Wasserstoffionenkonzentration, innerhalb gewissen Grenzen ändern, jedoch immer denselben Wert für dieselbe Zusammensetzung behalten[1]).

Fig. 23 zeigt die Variation von y mit S, indem y Ordinate und S Abszisse ist, während die drei Kurven drei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen darstellen $I: h = 25 \times 10^{-6}$, $II: h = 16 \times 10^{-6}$ und $III: h = 10 \times 10^{-6}$. Fig. 24 zeigt in analoger Weise die Abhängigkeit des z vom S, bei denselben Wasserstoffionenkonzentrationen.

---

[1]) Siehe hierüber besonders Compt. rend. du Laboratoire de Carlsberg. **12**. 357 ff. (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**. 112 ff. (1919).

c) Stickstoffbestimmung.

Schon die Einleitung dieser Abhandlung betont, daß die Eiweißchemie genaue Analysen verlangt. Die Anwendung der oben beschriebenen „Proportionalitätsmethode" verleiht noch dazu diesem Verlangen eine besondere Schärfe, was leicht verständlich ist, wenn man bedenkt, daß diese Methode auf die Festlegung von Differenzen in dem Ammoniak- bezw. Proteinstickstoffgehalt von „Filtrat" und „Kristallen mit anhaftender Mutterlauge" oder von „Innen- und Außenflüssigkeit" basiert. Es soll deshalb hier eine Anweisung folgen, wie man nicht nur die möglichst große absolute Genauigkeit, sondern auch, wo das von Belang ist, dieselbe relative Genauigkeit erreicht. Schon oben (S. 614) ist bei der Erwähnung der Bestimmung der Faktoren x, y und z bemerkt worden, daß es bei Untersuchungen dieser Art von größter Bedeutung ist, daß die Ammoniakstickstoffbestimmungen im „Filtrat" und im „Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge" oder in der „Innen- und Außenflüssigkeit" mit demselben prozentischen Fehler behaftet sind. Man muß deshalb bei solchen Analysen immer bemüht sein, durch vollständig gleichartige Behandlung der beiden vorliegenden Lösungen denselben Grad der Genauigkeit zu erreichen. Nehmen wir zum besseren Verständnis ein bestimmtes Beispiel: Bei der Analyse der ammoniumsulfat- und proteinhaltigen Innenflüssigkeit und der entsprechenden, aber proteinfreien Außenflüssigkeit, muß man solche Mengen der Lösungen in Arbeit nehmen, daß der Gehalt an Ammoniakstickstoff in den Proben der beiden Lösungen so nahe wie möglich der gleiche ist und sodann alle Proben ganz gleich behandeln. Wenn man nach Zusatz von Essigsäure und Natriumazetat (siehe S. 625) die Innenflüssigkeit, um das Eieralbumin auszukoagulieren, erhitzt, so muß man auch die Außenflüssigkeit in derselben Weise behandeln und sie ebensolange erhitzen, und zwar auch dann, wenn kein Niederschlag entsteht. Man muß alle Proben zur gleichen Zeit durch Filter derselben Art und Größe filtrieren sowie die Niederschläge der Innenflüssigkeit und die leeren Filter der Außenflüssigkeit gleichzeitig und mit derselben Menge Wasser auswaschen. Schließlich muß man beim Abdestillieren des Ammoniaks und bei der nachfolgenden Titrierung wechselweise Proben von der Außen- und der Innenflüssigkeit behandeln. Nur hiedurch kann man hoffen zu erreichen, daß die eventuellen Fehlerquellen soweit wie möglich bei den Analysen beider Lösungen dieselbe Rolle spielen, welches nach dem früher Entwickelten von wesentlicher Bedeutung ist (vgl. auch S. 634).

Da etwa 20 *mg* diejenige Stickstoffmenge ist, welche die genaueste *Kjeldahl*-Bestimmung gibt, so muß man, soweit es an-

geht, die zum Analysieren abgewogenen Proben der Innenflüssigkeiten oder der gelösten Niederschläge von einer solchen Größe nehmen, daß der Proteinstickstoff 15 bis 20 *mg* beträgt. Der Ammoniakgehalt des vom auskoagulierten Albumin abgelaufenen Filtrates wird infolgedessen bisweilen sehr groß, bisweilen ganz klein, und er wird deshalb je nachdem in verschiedener Weise ermittelt. Wenn sehr wenig Ammoniak vorhanden ist, dann wird der Ammoniakstickstoff in einer größeren Portion bestimmt, dessen Albumingehalt für die *Kjeldahl*-Bestimmung zu groß ist; neben dieser Bestimmung wird der Totalstickstoff in kleineren Proben nach *Kjeldahl* ermittelt, und der Unterschied zwischen dem Total- und dem Ammoniakstickstoff gibt dann den Proteinstickstoff.

Unten geben wir eine detaillierte Beschreibung des in den verschiedenen Fällen befolgten Verfahrens, und schließlich soll eine Reihe Kontrollversuche, welche zur Beleuchtung der Genauigkeit der Methoden gemacht ist, Erwähnung finden.

1. Bestimmung des Totalstickstoffes.

Eine gemessene oder gewogene Menge der zu analysierenden Lösung wird in einem langhalsigen Jenaerkolben (250 cm^3) nebst 20 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure, 5 *g* Kaliumsulfat und einem Stückchen Kupferdraht (etwa 50 *mg*), über einen guten *Argand*schen Brenner, anfänglich bis das Wasser verdampft ist, vorsichtig, später stärker erhitzt, so daß die Flüssigkeit immer auf dem Siedepunkte oder demselben sehr nahe ist. Man erhitzt — unter wiederholtem Schütteln, um alle verkohlten Partikel in die Flüssigkeit zu bringen und vollständig aufzuschließen — bis die Flüssigkeit rein hellgrün ist (zwei bis vier Stunden) und danach noch weiter fünf Stunden lang. Sodann oxydiert man die noch siedend heiße Flüssigkeit durch Einstreuen von dreimal einem Spatelvoll trockenes Kaliumpermanganatpulver, indem der Kolben nach jedem Spatelvoll gut geschüttelt wird. Nach Abkühlung zu Zimmertemperatur wird der Kolbeninhalt mit Wasser verdünnt und das Ammoniak in gewöhnlicher Weise abdestilliert.

Als „Kontrolle“ dienen Versuche mit denselben Mengen der angewandten Reagentien, wozu statt der zu analysierenden Lösung fünf Tropfen einer 10%igen Rohrzuckerlösung gegeben werden. Diese „Kontrollen“ werden gleichzeitig mit den eigentlichen Analysen erhitzt und auf ganz dieselbe Weise destilliert.

2. Bestimmung des Stickstoffes der anwesenden koagulierbaren Proteinstoffe.

Man mißt oder wiegt die zu analysierende Flüssigkeit in einem kleinen *Erlenmeyer*-Kolben (150 cm^3) ab, gibt 10 cm^3 n/1-Essig-

säure, 10 *cm*³ n/1-Natriumazetatlösung[1]) zu und füllt mit Wasser bis auf etwa 100 *cm*³ auf, wonach man auf dem siedenden Wasserbade eine halbe Stunde unter wiederholtem Schütteln erhitzt, was das Albumin zum Auskoagulieren bringt.

Nach Abkühlung[2]) wird durch ein soweit wie möglich stickstofffreies, mittels warmen Wassers ausgewaschenes Filter (z. B. die Marke „*C. Schleicher & Schüll* Nr. 589", 12·5 *cm*) filtriert und der Niederschlag gründlich mit warmem Wasser gewaschen. Danach wird das Filter mit dem Niederschlag in den Aufschließungskolben hineingebracht und wie unter *a*) beschrieben behandelt, indem man zuerst den beim Filtrieren und Koagulieren benützten Trichter und Kolben mit der zur Aufschließung bestimmten Schwefelsäure abspült.

Als „Kontrolle" dienen ähnliche blinde Versuche wie die unter *a*) beschriebenen, nur wird nicht Rohrzucker, sondern ein Filter zugegeben, welches von gleicher Art und Größe und in derselben Weise wie bei den eigentlichen Analysen gewaschen und behandelt worden ist.

3. Bestimmung des Stickstoffes der anwesenden nicht koagulierbaren Proteinstoffe.

Von stickstoffhaltigen Verbindungen enthält das von koaguliertem Proteinstoff befreite Filtrat[3]) die gegenwärtigen Ammoniumsalze nebst möglicherweise nicht koagulierbaren und in alkalischer Flüssigkeit nicht flüchtigen Körpern. Diese letzteren werden unter dem Namen „nicht koagulierbare Proteinstoffe" zusammengefaßt und deren Menge wird dadurch bestimmt, daß man das Ammoniak aus alkalischer Flüssigkeit abdestilliert und im Rückstand den Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt.

---

[1]) Soll der Ammoniakstickstoff des Filtrates ermittelt werden, dann gibt man vor der Koagulation, um eine etwaige Verflüchtung des Ammoniaks während des Erhitzens zu verhüten, nur 10 *cm*³ n/1- Essigsäure und 2 *cm*³ n/1-Natriumazetatlösung nebst Wasser zu, und die fehlenden 8 *cm*³ n/1-Natriumazetatlösung werden — um Infektion vorzubeugen — erst am Tage vor dem Filtrieren zugesetzt. Bei der von dem Puffergemisch „10 *cm*³ 1/n-Essigsäure — 10 *cm*³ n/1-Natriumazetatlösung" bedingten Wasserstoffionenkonzentration scheidet sich das koagulierte Eieralbumin vollständig aus.

[2]) Wenn der warme Kolben nach der Koagulation mit einer Glasplatte bedeckt wird, kann man ihn ohne Schaden viele Tage vor dem Filtrieren stehen lassen.

[3]) Das Filtrat wird sich gewöhnlich nur wenige Tage von Schimmelpilzen freihalten können. Da es indessen bei großen Versuchsreihen oft notwendig wird, Filtrate längere Zeit hindurch aufbewahren zu können, so kann man sofort nach dem Filtrieren 20 *cm*³ 2/n-Schwefelsäure zu jedem Filtrat zugeben; es läßt sich dann lange unverändert aufheben.



Das gesamte Filtrat vom koagulierten Proteinstoff oder ein aliquoter Teil desselben wird in einem geräumigen Kolben mit ein wenig Phenolphthalein und der zur Freimachung alles Ammoniaks notwendigen Menge 2/n-Natronlösung versetzt, wonach das Ammoniak im Vakuum bei einer Temperatur von 30° abdestilliert wird. Nachdem man fast zur Trockenheit eingedampft hat, nimmt man den Rückstand wieder in Wasser auf und die Lösung muß jetzt stark alkalisch reagieren, wenn nicht, ist mehr Natronlösung zuzufügen. Nach guter Abspülung sämtlicher Teile des Eindampfungsapparates wird wieder wie das erstemal fast zur Trockenheit verdampft; schließlich wird diese Operation zum dritten- und bei ammoniumsulfatreichen Filtraten noch zum viertenmal wiederholt. Der solcherweise erhaltene völlig ammoniakfreie Rückstand, wird mittels möglichst wenig Wassers in einen der gewöhnlichen Aufschließungskolben gebracht, konzentrierte Schwefelsäure zuerst bis zu saurer Reaktion vorsichtig zugefügt und danach noch weiter 10 cm^3. Nach Verdampfung des gegenwärtigen Wassers wird die Stickstoffbestimmung wie unter *a*) beschrieben durchgeführt, jedoch ohne Oxydieren mit Kaliumpermanganat.

Versuche, bei welchen reines Wasser oder eine Ammoniumsulfatlösung angemessener Stärke, wie oben beschrieben, mit denselben Mengen derselben Natronlösung, die bei den eigentlichen Analysen gebraucht wurden, eingedampft wird, dienen als „Kontrolle". In dem erhaltenen Rückstand bestimmt man den Stickstoff zu gleicher Zeit und in derselben Weise wie in den Analysen.

Daß diese Modifikation des *Kjeldahl*-Verfahrens vor der etwas schnelleren *Gunning-Arnold*schen vorgezogen ist, hat seinen Grund darin, daß man bei diesem letzteren, wie es von *R. Koefoed* nachgewiesen worden ist[1]), eher als bei dem hier befolgten Verfahren einem Stickstoffverlust ausgesetzt ist, weil die Temperatur der Aufschließungsflüssigkeit des größeren Kaliumsulfatgehaltes wegen eine höhere ist. Aus den Versuchen von *R. Koefoed* erhellt es nämlich, daß Stickstoffbestimmungen nach *Kjeldahl* immer zu niedrig ausfallen müssen, und zwar weil selbst reines Ammoniumsulfat durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure Stickstoff abgibt — unsicher in welcher Form — und desto mehr je höher die Temperatur und je länger die Dauer des Erhitzens sind. Eine Erhitzungsdauer von sechs Stunden gab bei einer üblichen *Kjeldahl*-Bestimmung einen Verlust von $^1/_3$% des Gesamtstickstoffes und ein 24stündiges Erhitzen gab den doppelten Verlust. Bei diesem Verfahren wird man deshalb wohl mit einem Verlust von etwa 0·5% des Gesamtstickstoffes rechnen müssen.

---

[1]) Compt. rend. des travaux du Laboratoire de Carlsberg. **10**. 52 (1911).

Die meisten der hier beschriebenen Untersuchungen sind vergleichender Natur, weshalb die absolute Konzentration des Proteins von untergeordneter Bedeutung ist, und die bei der Stickstoffbestimmung begangenen Fehler, die infolge der stetigen Anwendung desselben Verfahrens immer von derselben Größenordnung sind, keine nennenswerte Rolle spielen. Wird dagegen von der Bestimmung irgendeiner Konstante die Rede, dann ist der obenerwähnte Fehler der Methode nicht zu vernachlässigen. Selbstverständlich muß man die gefundenen Werte des Proteinstickstoffes bei der Berechnung benützen, bei der Beurteilung der solchermaßen berechneten Größe muß man sich aber erinnern, daß der benützte Wert des Proteinstickstoffes wahrscheinlich um etwa 0·5% zu niedrig ist.

4. Bestimmung des Ammoniakstickstoffes, wenn mehr als 50 *mg* vorhanden ist.

Das mit 20 *cm*³ 2/n-Schwefelsäure versetzte (siehe oben S. 626, Anmerkung[3]) Filtrat und Waschwasser vom auskoagulierten Eieralbumin, zusammen etwa 500 *cm*³, wird in einen gewogenen Literkolben gebracht, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gewogen. Von dieser Lösung wiegt man zum mindesten drei gleichgroße Proben, jede etwa 20 *mg* Ammoniakstickstoff enthaltend, ab. Aus diesen Proben destilliert man mittels Natronlauge das Ammoniak in eine mit etwa n/7-Salzsäure beschickte Vorlage ab und titriert die überschüssige Salzsäure jodometrisch[1]) mittels etwa n/14·01-Thiosulfatlösung in der üblichen Weise.

Gleichzeitig mit den Proben destilliert man in derselben Weise zwecks Festlegung des Titers der Thiosulfatlösung wenigstens drei gewogene Proben einer Lösung von reinem, bei 70° im Vakuum getrocknetem Ammoniumsulfat, welches somit die Urtitersubstanz aller Analysen wird. Auch die Größe dieser Proben wird derart bemessen, daß jede etwa 20 *mg* Stickstoff enthält, und zu jeder Probe werden dieselben Mengen von Essigsäure, Natriumazetat und Schwefelsäure gegeben, wie diejenige, die in den Analysen vorhanden sind. Als „Kontrolle“ sowohl für die „Analyseproben“ als auch für die „Einstellungsproben“ destilliert man reines Wasser, zu welchem man dieselben Mengen sämtlicher Reagentien gefügt hat, wie zu den Analysen.

Die bei der Destillation angewandte Wassermenge wird so bemessen, daß das Gesamtvolumen 300 bis 325 *cm*³ wird, und hierzu gibt man 25 *cm*³ starke Natronlauge. Das Destillat wird in

---

[1]) Bezüglich der Prinzipe der jodometrischen Säuretitrierung wird auf *R. Koefoed*: Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **10**. 52 (1911) verwiesen.

15 *cm*³ etwa n/7-Salzsäure aufgefangen und es wird so viel abdestilliert (etwa 150 bis 180 *cm*³), daß man nach dem Titrieren ein Totalvolumen von etwa 200 *cm*³ hat.

Um weiter nach Möglichkeit eventuelle Fehlerquellen unschädlich zu machen, sind die Destillationen immer in nachstehender Reihenfolge ausgeführt worden: Zuerst wird der Destillationsapparat reinigungshalber a u s g e d a m p f t, indem man reines, mit ein wenig Natronlauge versetztes Wasser ohne Kühlwasser destilliert. Sodann destilliert man die „Kontrolle". Die nächste Destillation gilt einer Ammoniumsulfatlösung mit annäherungsweise derselben Menge Ammoniak wie die zu untersuchenden Proben und dann erst geht man zur Destillation der „Analysen"- und der „Einstellungsproben" über. Der Zweck dieser „vorbereitenden" Destillation, bei welcher die gewöhnlichen 15 *cm*³ n/7-Salzsäure vorgelegt sind, ist derjenige der Destillationsapparat v o r der ersten Destillation genau in den gleichen Stand wie n a c h derselben, das heißt v o r der zweiten Destillation zu bringen. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß, auch wenn das Volumen bei der Destillation innerhalb der genannten Grenzen gehalten und das Destillieren so weit wie oben angegeben getrieben wird, kleine, aber durch die *Neßler*-Probe sicher nachweisbare Ammoniakmengen im Destillierapparat zurückgehalten werden. Es ist mit Rücksicht hierauf, daß die oben genannte vorbereitende Destillation notwendig wird, damit man darauf sicher sein kann, daß sämtliche Proben, sowohl die der „Analyse" als auch die der „Einstellung" unter genau denselben Bedingungen destilliert werden und daß demgemäß eventuelle Fehler die Analysen und die Einstellung des Thiosulfates gleichmäßig beeinflussen und sich deshalb gegenseitig aufheben.

5. B e s t i m m u n g d e s A m m o n i a k s t i c k s t o f f e s, w e n n 25 b i s 50 *mg* v o r h a n d e n s i n d.

Filtrat und Waschwasser werden in einen Meßkolben bis auf 500 *cm*³ aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und dann mittels eines 250 *cm*³-Meßkolbens in zwei ungefähr gleiche Teile geteilt. Jeder dieser Teile wird getrennt destilliert und titriert, indem jeder der Meßkolben mit 50 bis 75 *cm*³ Wasser nachgespült wird. D e r G e h a l t d e s F i l t r a t e s a n A m m o n i a k s t i c k s t o f f w i r d d e m n a c h a l s d i e S u m m e d e r b e i d e n T i t r i e r u n g e n e r h a l t e n. Übrigens ist das Verfahren ganz wie unter 4 beschrieben, nur wählt man natürlich den Ammoniakgehalt der „Einstellungsproben" dem Gehalt der einen Hälfte des Filtrates einigermaßen gleich.

6. Bestimmung des Ammoniakstickstoffes, wenn 10 bis 25 *mg* vorhanden sind.

In diesem Fall muß das Volumen des Filtrates nach Zusatz der 20 *cm*³ 2/n-Schwefelsäure etwa 300 *cm*³ ausmachen, und das gesamte Filtrat wird auf einmal destilliert, indem man mit 25 bis 30 *cm*³ Wasser nachspült. Die „Einstellungsproben" erhalten eine Ammoniakmenge gleich derjenigen des Gesamtfiltrates; übrigens verfährt man wie oben beschrieben.

7. Bestimmung des Ammoniakstickstoffes, wenn weniger als 10 *mg* vorhanden ist.

Je kleiner der Gehalt des Filtrates an Ammoniak ist, um so größer ist die Rolle, die die obengenannte Fehlerquelle, Zurückhalten von ganz kleinen Ammoniakmengen sowohl im Destillationskolben als auch im Wasch- und Kühlapparat, spielt, und zwar weil man selbstverständlich nicht damit rechnen darf, daß diese kleinen Mengen gleich groß sind, auch nicht dann, wenn gleichgroße Mengen von Ammoniak abzudestillieren sind und die Destillation das eine wie das andere Mal soweit als irgend möglich in derselben Weise geleitet wird. Hierzu kommt noch außerdem, daß es, wenn sehr ammoniumsulfatarme Albuminlösungen zu verarbeiten sind, notwendig wird, daß man ziemlich reichlich bemessene Mengen der Lösung zur Analyse nimmt, weil die zur Bestimmung kommende Ammoniakmenge sonst zu winzig wird[1]). Wegen der großen Menge von Eieralbumin muß dann vor der Koagulation etwas mehr Wasser als gewöhnlich (150 bis 200 *cm*³) zugesetzt werden und aus demselben Grunde muß mehr Wasser beim Auswaschen benützt werden. Der Rauminhalt des Filtrates wird deshalb so groß, daß das Ammoniak sich kaum durch eine einfache Destillation so vollständig abtreiben läßt, daß man von der oben genannten Fehlerquelle absehen darf. In diesem Falle kommt deshalb ein etwas umständlicheres Verfahren zur Verwendung.

Das auskoagulierte Albumin wird wie üblich abfiltriert und gewaschen, wenn aber das gesamte Volumen von Filtrat und Waschwasser 500 *cm*³ erreicht hat (Filtrat I), dann wird der Niederschlag — falls wesentlich größer als gewöhnlich — aus dem Filter genommen und mit warmem Wasser in einer Schale gut ausgerührt, wonach er wieder auf den Filter gebracht und mit warmem Wasser gewaschen wird, bis dieses zweite Filtrat (Filtrat II), welches getrennt gesammelt wird, 300 *cm*³ ausmacht. Das ganze Filtrat I wird auf

[1]) In solchen Fällen wird der Proteinstoff als der Unterschied zwischen dem Gesamtstickstoff (in besonderen Proben nach 1. bestimmt) und dem Ammoniakstickstoff bestimmt.



einmal destilliert (es wird mit 25 bis 30 *cm*³ Wasser nachgespült), das Ammoniak in etwa n/35-Salzsäure aufgefangen und der Überschuß der Salzsäure jodometrisch mittels etwa n/70·05-Thiosulfates zurücktitriert. Die Destillation wird übrigens nach 4 ausgeführt; nachdem aber diese erste Destillation, bei welcher so gut wie alles Ammoniak übergeht, zu Ende gebracht ist, wird ein langhalsiger mit 5 *cm*³ n/7-Salzsäure beschickter 200 *cm*³ Meßkolben als Vorlage eingeschaltet und die Destillation fortgesetzt, bis das Destillat den Meßkolben zur Marke füllt. Der Ammoniakgehalt dieses zweiten Destillates wird durch Zugabe von 5 *cm*³ n/5-Natronlösung nebst 2 *cm*³ alkalischer Kaliumquecksilberjodidlösung[1]) kolorimetrisch nach *Neßler* bestimmt. Das Destillat des Filtrates II wird ebenfalls in einem 200 *cm*³-Meßkolben aufgefangen und das Ammoniak nach *Neßler* bestimmt.

Man benützt in diesen Fällen immer frisch ausgekochte Natronlauge bei der Destillation und es folgt von selbst, daß man darum besorgt sein muß, daß die „Analyse"- und die „Einstellungsproben" soweit als irgend möglich gleich behandelt werden. Die Vergleichflüssigkeit bei den *Neßler*-Bestimmungen bereitet man aus Ammoniumsulfatlösungen von bekannter Stärke, indem eine abgemessene, passende Menge mit 5 *cm*³ n/7-Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 200 *cm*³ aufgefüllt wird, wonach 5 *cm*³ n/5-Natronlösung nebst 2 *cm*³ der Kaliumquecksilberjodidlösung zugegeben werden. Die eigentliche Bestimmung der Farbenstärke der „*Neßler*-Analysen", das Vergleichen mit derjenigen der Vergleichsflüssigkeiten, wird am Tage nach der Herstellung der Proben mittels eines gewöhnlichen Kolorimeters gemacht.

8. Beispiele und Belege.

Die im folgenden mitgeteilten Versuchsreihen dienen als Beispiele der Genauigkeit, mit welcher sich die Ammoniakbestimmung in dieser Weise ausführen läßt, sowohl in der Gegenwart größerer und kleinerer Mengen Albumins als auch ohne solche.

Als Ur- oder Stammlösung diente bei diesen Versuchen eine Ammoniumsulfatlösung, welche 783·6 *mg* Ammoniakstickstoff in 100 *g* Lösung enthielt, was bei einer früheren sehr sorgfältigen Analyse festgelegt worden war.

Die benützte Lösung von Albumin war aus kristallisiertem Eieralbumin dargestellt, welches in der später beschriebenen Weise von Ammoniak befreit worden war. 100 *cm*³ dieser Lösung enthielten 226·6 *mg* Proteinstickstoff, aber nur 0·03 *mg* Ammoniakstickstoff.

Es wurden drei Versuchsreihen mit verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen und demzufolge mittels verschiedener Ammoniakbestimmungsmethoden ausgeführt.

---

[1]) Bezüglich der Kaliumquecksilberjodidlösung wird auf *A. Classen* (Analytische Chem. 2. 115 [1913]) verwiesen.

Tabelle 3.

Versuchsreihe *A*.

(Stärke der Thiosulfatlösung: 1·0022 . n/14·01.)

Versuchs-nummer	Gewicht von 50 cm^3 der Urlösung	Gewicht nach der Verdünnung bis zu 1 *l*	Gewicht der bei der Destillation benützten 3 . 50 cm^3	Beim Titrieren wurde eine *a* cm^3 der Thiosulfat-lösung ent-sprechende Ammoniakmenge gefunden
	g	*g*	*g*	*a*
	Ohne Eieralbumin			
1	50·9466	1000·01	49·8106 49·8206 49·7794	19·90 19·88 19·86
2	50·9504	1000·01	49·8085 49·8057 49·7971	19·85 19·85 19·90
3	50·9480	1000·23	49·8315 49·8058 49·8677	19·91 19·85 19·92
Mittel .	50·9483	1000·08	49·8141	19·880
100 *g* der Urlösung enthalten demnach 785·1 *mg*[1]) Ammoniakstickstoff.				
	Mit Eieralbumin (22·66 *mg* Proteinstickstoff)			
4	50·9592	1000·04	49·7904 49·7854 49·7914	19·91 19·91 19·87
5	50·9678	1000·21	49·8000 49·7977 49·7758	19·88 19·87 19·84
6	50·9512	1000·21	49·7976 49·8522 49·8206	19·90 19·89 19·89
Mittel .	50·9594	1000·15	49·8012	19·884[2])
100 *g* der Urlösung enthalten demnach 785·3 *mg* Ammoniakstickstoff.				

[1]) $\frac{19{\cdot}880 \times 1{\cdot}0022 \times 1000{\cdot}08 \times 100}{49{\cdot}8141 \times 50{\cdot}9483} = 785{\cdot}1.$

[2]) Die Korrektion wegen des Ammoniakgehaltes des Eiweiß ist hier verschwindend klein, nämlich 0·003 × $^{50}/_{1000}$ *mg* Ammoniakstickstoff.

Versuchsreihe A.
(Versuche Nr. 1 bis 6.)

Bei jedem Versuch wurden 50 *cm*³ Urlösung (gewogen) in Arbeit genommen. In den Versuchen Nr. 1 bis 3 wurde kein Eieralbumin, sondern nur Essigsäure, Natriumazetat und Schwefelsäure zugegeben und das Ammoniak nach 4 bestimmt.

In den Versuchen Nr. 4 bis 6 dagegen wurden 10 *cm*³ Albuminlösung zugegeben, wonächst die Lösung nach Zusatz von Essigsäure und Natriumazetat (siehe S. 626, Anmerkung) nach 2 zur Koagulation gebracht wurde. Nachdem der Niederschlag abfiltriert war, wurde der Ammoniakstickstoff des Filtrates wie unter 4 ermittelt.

Die Resultate sind in der nebenstehenden Tabelle 3 zusammengetragen.

Versuchsreihe B.
(Versuche Nr. 7 bis 14.)

Tabelle 4.

Versuchsreihe *B*.
(Stärke der Thiosulfatlösung: 1·0022 . n/14·01.)

Versuchsnummer	Beim Titrieren wurde eine *a cm*³ der Thiosulfatlösung entsprechende Menge Ammoniak gefunden *a*
	Ohne Eieralbumin
7	19·94
8	19·94
9	19·91
10	19·91
Mittel........	19·925
100 *g* der Urlösung enthalten somit 784·2 *mg* Ammoniakstickstoff	
	Mit Eieralbumin (22·66 *mg* Proteinstickstoff)
11	19·94
12	19·95
13	19·93
14	19·94
Mittel........	19·940[1])
100 *g* der Urlösung enthalten somit 784·6 *mg* Ammoniakstickstoff	

[1]) Die Korrektion wegen des Ammoniakgehaltes der Albuminlösung ist hier gleich 0·003 *mg* Ammoniakstickstoff.

50 cm^3 der Urlösung wurden abgewogen (Gewicht 50·9310 *g*) und in einem geeichten Meßkolben bis auf 1 *l* verdünnt. Für jeden Versuch wurden mittels einer geeichten Pipette 50 cm^3 der verdünnten Lösung, die nicht gewogen wurden, herausgenommen.

Bei den Versuchen Nr. 7 bis 10 wurde kein Eieralbumin zugefügt. Das Ammoniak wurde nach 6 bestimmt.

Bei den Versuchen 11 bis 14 wurden 10 cm^3 Eieralbuminlösung zugesetzt. Nach vollbrachter Koagulation usw. bestimmte man den Ammoniakstickstoff nach 6.

Die Resultate findet man in der untenstehenden Tabelle 4.

Versuchsreihe C.

(Versuche Nr. 15 bis 26.)

20 cm^3 der Urlösung wurden abgewogen (Gewicht 20·3881 *g*) und in einem geeichten Meßkolben bis auf 1 *l* verdünnt. Für jeden Versuch wurden mittels einer geeichten Pipette 50 cm^3 der verdünnten Lösung, die nicht gewogen wurden, herausgenommen.

Bei den Versuchen Nr. 15 bis 18 wurde kein Eieralbumin zugefügt. Das Ammoniak wurde nach 7 bestimmt.

Bei den Versuchen Nr. 19 bis 22 wurden 10 cm^3 und bei den Versuchen Nr. 23 bis 26 50 cm^3 Eieralbuminlösung zugegeben. Nach vollbrachter Koagulation usw. wurde der Ammoniakstickstoff nach 7 bestimmt.

Die Resultate findet man in der nebenstehenden Tabelle 5.

100 *g* der Urlösung enthalten also:

		Ammoniak-stickstoff
Nach der ursprünglichen Bestimmung		783·6 *mg*
Versuchsreihe *A*	Ohne Eieralbumin	785·1 „
	Mit „	785·3 „
„ *B*	Ohne „	784·2 „
	Mit „	784·6 „
„ *C*	Ohne „	789·0 „
	Mit einigem „	790·7 „
	Mit vielem „	792·5 „

Man ersieht hieraus, daß die Bestimmungen innerhalb jeder Versuchsreihe gegenseitig gut übereinstimmen, besser als die verschiedenen Versuchsreihen untereinander. Nun ist es im vorausgehenden mehreremal erwähnt worden und soll hier nur eben hervorgehoben werden, daß gerade die gegenseitige Übereinstimmung der mit proteinfreien Lösungen einerseits und proteinhaltigen andererseits erhaltenen Analysenresultate für die uns hier beschäftigenden Untersuchungen von größtem Belang ist. Wenn

Tabelle 5.

Versuchsreihe *C*.

(Stärke der Thiosulfatlösung: 1·0340 . n/70·05.)

Versuchs-nummer	Beim Titrieren wurde eine *a cm*³ Thiosulfatlösung entsprechende Ammoniakmenge gefunden *a*	Die bei der *Neßler*-Bestimmung gefundene Ammoniakmenge entsprach *n mg* Stickstoff *n*	Die bei der *Neßler*-Bestimmung gefundene Ammoniakmenge entsprach *b cm*³ Thiosulfatlösung $b = n \cdot \frac{5}{1 \cdot 0340}$	Korrigierte Menge zirka n/70·05 Thiosulfatlösung *a* + *b*
	Ohne Eieralbumin			
15	38·80	0·023	0·111	38·911
16	38·65	0·033	0·160	38·810
17	38·55	0·065	0·314	38·864
18	38·70	0·061	0·295	38·995
Mittel				38·895
100 *g* Urlösung enthalten demnach 789·0 *mg* Ammoniakstickstoff				
	Mit einigem Eieralbumin (22·66 *mg* Proteinstickstoff)			
19	38·75	0·046	0·222	38·972
20	38·75	0·060	0·290	39·040
21	38·75	0·043	0·208	38·958
22	38·75	0·052	0·251	39·001
Mittel				38·993[1])
100 *g* Urlösung enthalten demnach 790·7 *mg* Ammoniakstickstoff.				
	Mit viel Eieralbumin (113·3 *mg* Proteinstickstoff)			
23	39·00	0·043	0·208	39·208
24	38·85	0·063	0·305	39·155
25	38·95	0·032	0·155	39·105
26	38·75	0·069	0·334	39·084
Mittel				39·138[1])
100 *g* Urlösung enthalten demnach 792·5 *mg* Ammoniakstickstoff.				

[1]) Die Korrektion wegen des Ammoniakgehaltes der Albuminlösung beträgt hier 0·003 *mg* Ammoniakstickstoff, was 0·015 *cm*³ der angewandten zirka n/70·05-Thiosulfatlösung entspricht.

aber auch die Abweichung innerhalb jeder Versuchsreihe die Grenzen des Versuchsfehlers kaum überschreiten, so macht sich jedoch eine deutliche Neigung in der bestimmten Richtung geltend, daß die Bestimmung um so höher ausfällt, je größer die bei der Koagulation vorhandene Eieralbuminmenge im Verhältnis zum Ammoniak ist. Ob es sich hier nur um Versuchsfehler handelt, oder ob dieses Verhalten mit der Koagulation des Eieralbumins in irgendeinem Zusammenhang steht, das läßt sich vorläufig noch nicht entscheiden.

Bezüglich der Übereinstimmung der einzelnen Versuchsreihen untereinander bemerkt man, daß *A* und *B* mit der ursprünglichen Bestimmung gut stimmen, indem die größte Abweichung vom Mittel (784·6 *mg*) hier nur etwa 1:800 beträgt. Größer wird der Versuchsfehler, wenn die zu bestimmende Menge Ammoniumsulfat, wie in der Reihe *C*, nur klein ist (etwa 8 *mg* Stickstoff). Bei der proteinfreien Lösung beträgt die Abweichung vom oben angeführten Mittel ungefähr 0·5% und bei der proteinreichen Lösung sogar 1%[1]). Liegen also nur kleine Ammoniakmengen zur Bestimmung vor, dann kann man auf eine größere absolute Genauigkeit als die oben gefundene kaum rechnen, aber auch in solchen Fällen wird der Fehler wahrscheinlich dasselbe Vorzeichen besitzen, wenn man Bestimmungen in proteinfreien und proteinhaltigen Lösungen zu gleicher Zeit und auf dieselbe Weise ausführt, dermaßen, daß der prozentische Fehler der Differenz zweier solchen Bestimmungen einigermaßen von derselben Größenordnung sein wird wie der Fehler der Einzelbestimmungen.

Schließlich werden wir den Gang einer „Proportionalitätsanalyse“ durch ein Beispiel illustrieren.

500 cm^3 einer Eieralbuminlösung (siebenmal umkristallisiert; 1 cm^3 enthielt 12·04 *mg* Proteinstickstoff) wurden unter gutem Schütteln mit 220 cm^3 gesättigter Ammoniumsulfatlösung nebst zehn Tropfen Impfungsmaterial versetzt. Sowohl die Eieralbumin- wie auch die Ammoniumsulfatlösung hatten vor der Mischung eine Temperatur von 19° und nach derselben wurde die Masse in einem mit einem Kautschukstöpsel geschlossenen Kolben bei 19° der Kristallisation überlassen, dieselbe dauerte elf Tage im ganzen, während welcher Zeit der Kolben jeden Tag gut geschüttelt wurde.

Nach elf Tagen wurde im Thermostaten bei 19° filtriert; um Verdampfung zu vermeiden, benützte man eine der gewöhnlichen konischen Filtrierflaschen mit eingeschliffenem Trichter, dessen oberer Rand geschliffen und mit einer zugeschliffenen Glas-

[1]) Der in der Versuchsreihe C gefundene größere Wert des Stickstoffgehaltes der Urlösung rührt nicht davon her, daß in dieser Reihe durch die *Neßler*-Bestimmungen die gefundene Ammoniakmenge vergrößert worden ist, denn auch die Einstellung der Thiosulfatlösung ist durch *Neßler*-Bestimmungen verschärft worden, wodurch ihr Titer entsprechend verkleinert wird.



platte bedeckt war; dieselbe hatte in der Mitte ein Loch, in welches ein gebogenes Glasrohr luftdicht eingesetzt war, und dieses Rohr verband ein Kautschukschlauch mit dem Seitenansatz der Filtrierflasche. Der Adsorptionsfähigkeit des Filtrierpapiers wegen wurden die zuerst durchgelaufenen 20 cm^3 nicht benützt, aber in einen Meßzylinder gesammelt und dann erst der Trichter in die Filtrierflasche gebracht.

Als die Filtrierung nach etwa vier Stunden beinahe beendet war, wurden $3 \times 50\ cm^3$ des Filtrates abgemessen, gewogen und zur Analyse des Filtrates benützt. Aus der auf dem Filter zurückgebliebenen Masse wurde die noch nicht durchgelaufene über dem Niederschlage stehende Mutterlauge mittels einer Pipette entfernt, wonächst Niederschlag und der Rest der Mutterlauge so schnell wie nur möglich auf dem Filter mittels eines Spatels gemischt wurden. Aus der solchermaßen erhaltenen breiartigen Mischung von Niederschlag und Mutterlauge wurden mittels einer Pipette mit abgebrochener Spitze drei Proben genommen, jede auf 10 cm^3, die vorsichtig in je einen gewogenen 100 cm^3-Meßkolben gebracht wurden, wonach man das Gewicht des Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge durch Wägen ermittelte. Nach Auflösen in Wasser und Verdünnen bis auf 100 cm^3 wurde aufs neue gewogen und sodann nach gutem Schütteln aus jeder der drei Proben $4 \times 10\ cm^3$ herauspipettiert, welche gewogen und zur Analyse des Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge benützt wurden.

Der Proteinstickstoff wurde nach der Methode 2 (siehe S. 625), der Ammoniakstickstoff im Filtrate nach der Methode 4 (siehe S. 628) und der Ammoniakstickstoff des Niederschlages nach der Methode 5 (siehe S. 629) bestimmt. Die Analysenresultate sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

d) Bestimmung des Säurebindungsvermögens.

Das Säurebindungsvermögen des Eihydrates läßt sich durch eine Wasserstoffionenmessung der Lösung unter den folgenden Voraussetzungen bestimmen:

Erstens betrachten wir eine Eieralbuminlösung als eine echte Lösung eines sehr komplizierten amphoteren Körpers, zweitens sehen wir in einer solchen Lösung ein zweiphasiges disperses System, wo das Eihydrat die disperse Phase bildet, während das Lösungsmittel, sei es Wasser oder mehr oder weniger verdünnte Ammoniumsulfatlösungen, als Dispersionsmittel fungiert; und drittens endlich setzen wir voraus, daß die Wasserstoffionenkonzentration eines solchen Systems lediglich durch die Zusammensetzung des Dispersionsmittels bestimmt und von der Art und Konzentration der dispersen Phase nicht beeinflußt wird. Diese letztere Voraussetzung ist zwar nicht ganz richtig, besonders nicht dann, wenn die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung in der Nähe des isoelektrischen

Tabelle 6.

Filtrat.

Nr. des Kolbens	Abgewogene Menge	Nach Koagulieren, Filtrieren usw.			
		wurde das Filtrat auf 1 *l* aufgefüllt, um den Ammoniak-N zu bestimmen; für jede Destillation wurden 10 cm^3 genommen			wurde im Niederschlag der Protein-N bestimmt; derselbe entspricht cm^3 zirka n/14·01 Thiosulfatlösung[2])
		Gewicht 1 *l*	10 cm^3 wogen	Ammoniak-N entsprach cm^3 zirka n/14·01 Thiosulfatlösung[1])	
	g	*g*	*g*		
4	56·333	1006·68	10·066 10·081 10·080	26·58 26·63 26·65	13·33
11	56·357	1006·70	10·036 10·036 10·026	26·58 26·54 26·53	13·33
12	56·386	1006·81	10·025 10·017 10·030	26·51 26·53 26·54	13·34
Mittel .	56·359	1006·73	10·044	26·565	13·33

100 *g* Filtrat enthalten demnach 4·6966 *g* Ammoniak-N (a_f).
100 *g* „ „ „ 0·0235 *g* Protein-N (p_f).

[1]) 0·9924.n/14·01.
[2]) 0·9941.n/14·01.

Zu Tabelle 6.

Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge.

Nr. des Kolbens	Von den 100 cm^3 wurden 4.10 cm^3 entnommen Gewicht g	Der Ammoniak-N in 10 cm^3 entsprach cm^3 zirka n/14·01-Thiosulfatlösung[1])	Der Protein-N in 10 cm^3 entsprach cm^3 zirka n/14·01-Thiosulfatlösung[2])
Die Probe I wog 11·4526 g, zu 100 cm^3 gelöst war das Gewicht 101·354 g.			
13	10·100	2.21·53	29·72
14	10·093	2.21·59	29·64
15	10·106	2.21·62	29·68
17	10·103	2.21·51	29·79
Mittel .	10·1005	2.21·563	29·71
100 g der Probe I enthalten demnach 3·7563 g Ammoniak-N (a_b).			
100 g „ „ I „ „ 2·5834 g Protein-N (p_b).			
Die Probe II wog 11·6101 g, zu 100 cm^3 gelöst war das Gewicht 101·444 g.			
21	10·159	2.21·67	31·62
22	10·171	2.21·68	31·37
25	10·174	2.21·69	31·40
27	10·170	2.21·69	31·33
Mittel .	10·1685	2.21·682	31·43
100 g der Probe II enthalten demnach 3·7042 g Ammoniak-N (a_b).			
100 g „ „ II „ „ 2·6802 g Protein-N (p_b).			
Die Probe III wog 11·0118 g, zu 100 cm^3 gelöst war das Gewicht 101·313 g.			
29	10·100	2.20·71	29·29
30	10·115	2.20·63	29·31
31	10·066	2.20·49	29·24
32	10·129	2.20·57	29·49
Mittel .	10·1025	2.20·600	29·33
100 g der Probe III enthalten demnach 3·7300 g Ammoniak-N (a_b).			
100 g „ „ III „ „ 2·6508 g Protein-N (p_b).			

[1]) 0·9941 . n/14·01.
[2]) 0·9924 . n/14·01.

Wendet man die Formel

$$r = 100 \frac{(a_f \div a_b)}{a_f . p_b \div a_b . p_f}$$

auf diese Versuchsergebnisse an, erhält man aus:

Filtrat und Probe I: $r = 7{\cdot}80_7$
„ „ „ II: $r = 7{\cdot}93_9$
„ „ „ III: $r = 7{\cdot}81_9$
Mittel: $r = 7{\cdot}85_5$

Punktes des Albumins liegt — d. h. bei sehr kleinen Säuremengen — und in solchen Fällen versagt deshalb die Methode. In den meisten Fällen aber bekommt man eine sehr annähernd richtige Bestimmung.

Kennt man hiernach die in einer vorliegenden Lösung gegenwärtigen Mengen von Eihydrat, Ammoniumsulfat und überschüssiger Schwefelsäure, dann findet man unter diesen Voraussetzungen das Säurebindungsvermögen des Eihydrates in folgender Weise: Die ganze Menge überschüssiger Schwefelsäure sei in 100 cm^3 Versuchsflüssigkeit t cm^3 n/1000, die im Dispersionsmittel existierende sei t' cm^3 und der vorhandene Proteinstickstoff sei e Milligrammäquivalente; dann wird das Säurebindungsvermögen

$$b = \frac{t - t'}{e}.$$

Man ersieht, daß es, um das Säurebindungsvermögen durch eine Wasserstoffionenmessung bestimmen zu können, notwendig ist, erstens die Beziehung zu kennen, welche in einer Ammoniumsulfatlösung zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und dem Gehalt an überschüssiger Säure existiert und zweitens das Volum des Dispersionsmittels in einer Eieralbuminlösung bestimmen zu können.

Was erstens die Beziehung zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und dem Überschuß an Säure einer Ammoniumsulfatlösung betrifft, dann findet man, daß, wenn h die Wasserstoffionenkonzentration und s die Konzentration der überschüssigen Säure bedeutet, die gesuchte Beziehung sich durch die Gleichung

$$s + x = fh$$

ausdrücken läßt, indem f einen von der Salzkonzentration allein abhängigen Faktor bedeutet, während x die bei der Hydrolyse des Salzes freigemachte Säurekonzentration darstellt. Letztere wird bei einigermaßen großen Werten von s verschwindend klein, so daß in diesem Fall die Gleichung die einfachere Form

$$s = fh$$

annimmt[1]).

[1]) Zu bemerken ist hier, daß, wenn man die Wasserstoffionenkonzentration einer mit überschüssiger Säure versetzten Lösung von käuflichem Ammoniumsulfat, auch das reinste, durch Messung bestimmt, dann bekommt man nicht Resultate, die der Gleichung $s = fh$ gehorchen. Vielmehr wird man sie immer durch die Gleichung $s + y = fh$ ausgedrückt finden, wo y bald positiv und bald negativ, je nach der Probe des Salzes, sein kann. Dies hat aber mit der Hydrolyse des Salzes nichts zu tun. Es ist nur ein Ausdruck dafür, daß das untersuchte Salz einen Überschuß an einem der Bestandteile enthält: Schwefelsäure, wenn y positiv, Ammoniak, wenn y negativ ist. Dieser Überschuß, der immer vorhanden ist, meistens aber 1:50.000 der ganzen Menge nicht überschreitet, läßt sich eben in dieser Weise bestimmen und muß selbstverständlich bei den mit dem Salz vorgenommenen Untersuchungen in die Rechnung mitbezogen werden. Über die ins einzelne durchgeführten Rechnungen siehe: Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12**. 68 (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103**. 105 (1918).

Der Zusammenhang zwischen dem Faktor f und der Salzkonzentration läßt sich durch Versuche ermitteln und die Fig. 25 stellt eine Kurve dar, auf welche die Salzkonzentration als Ordinate und der Faktor f, der Säurefaktor, als Abszisse aufgeführt sind.

Mittels dieser Kurve kann man jetzt aus der gemessenen Wasserstoffionenkonzentration, h, mit hinlänglicher Genauigkeit s mittels der Gleichung $s = hf$ berechnen, wenn die Wasserstoff-

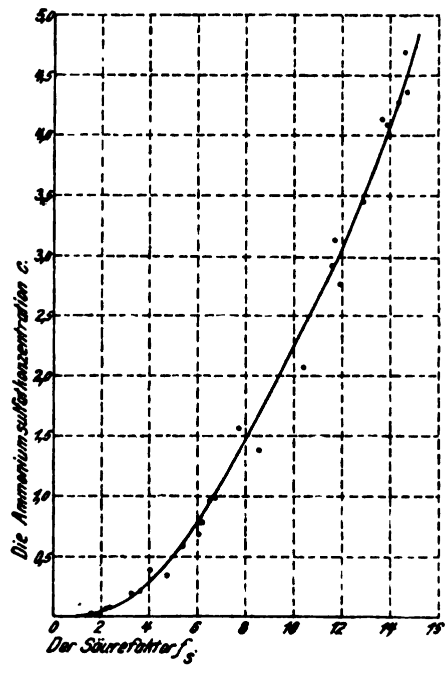


Fig. 25.

ionenkonzentration größer als etwa $15 \times 10^{\div 6}$ ist, in welchen Fällen die Hydrolyse und damit x zu vernachlässigen ist. Bei niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen kann man aber von x nicht absehen. Die Berechnung gibt, daß man dann

$$s = hf \div \frac{(x_{max})^2}{hf}$$

bekommt, wo x_{max} eine Funktion der Konzentration des Salzes ist und den Maximalwert bedeutet, den x für $s = o$ annimmt Dieser Wert läßt sich — durch Methoden[1]), auf die einzugehen

[1]) Man findet $(x_{max})^2 = c \cdot \frac{k_w}{k_m} \cdot \frac{\beta_1 (1 + \beta_2)}{2} \cdot f$, wo c die Äquivalentkonzentration des Ammoniumsulfates, k_w die Dissoziationskonstante des Wassers $= 0{\cdot}72 \cdot 10^{\div 14}$ (18°) (Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de

hier zu weit fühlen würde — finden, so daß man in allen Fällen imstande ist, s aus h zu berechnen.

Die Berechnung des Volums des Dispersionsmittels versteht man am leichtesten durch das folgende Beispiel:

100 cm^3 Versuchsflüssigkeit enthielten 42·24 mg-äquivalenten Proteinstickstoff, und war beziehentlich das Ammoniumsulfat 0·358 n, was $S = 2·4$ bedeutet (S ist die auf 100 g Wasser kommende Menge Ammoniumsulfat).

Aus den oben gegebenen graphischen Darstellungen der Abhängigkeit zwischen S einerseits und z bezw. y andererseits erhellt es, daß z (der Faktor, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffes zu multiplizieren ist, um das Gesamtgewicht der dispersen Phase zu geben) und y (der Faktor, mit welchem man das Gewicht des Proteinstickstoffes multiplizieren muß, um das Gewicht des in der dispersen Phase eingegangenen Ammoniumsulfates zu bekommen) für $S = 2·4$ die Werte $z = 8·08$ und $y = 0·0257$ besitzen.

Das Gewicht der in 100 cm^3 Versuchsflüssigkeit gegenwärtigen dispersen Phase wird demgemäß (in Grammen):

$$\frac{42·24 \times 14·01 \times 8·08}{1000}$$

und wird das spezifische Gewicht der dispersen Phase gleich 1·27 gesetzt (die Ermittlung dieses spezifischen Gewichtes ist durch noch nicht publizierte Versuche geschehen), so wird das Volumen der dispersen Phase (in cm^3)

$$\frac{42·24 \times 14·01 \times 8·08}{1000 \times 1·27} = 3·77$$

Das Gewicht der in der dispersen Phase enthaltenen Menge Ammoniumsulfat wird (in Grammen):

$$\frac{42·24 \times 14·01 \times 0·0257}{1000};$$

in 100 cm^3 verteilt wird dieses Gewicht von Ammoniumsulfat der Konzentration

$$\frac{42·24 \times 14·01 \times 0·0257}{1000 \times 66·08} \times \frac{1000}{100} = 0·002 \,.\, n.$$

entsprechen.

Daraus ergibt sich das Volumen V_a des in 100 cm^3 Versuchsflüssigkeit vorhandenen Dispersionsmittels zu

$$V_a = 100 \div 3·77 = 96·23 \; cm,$$

und diejenige Konzentration c des Ammoniumsulfates, welche in dem die disperse Phase umgebenden Dispersionsmittel wirklich vorhanden ist, wird:

$$c = \frac{(0·358 \div 0·002) \times 100}{96·23} = 0·370 \,.\, n.$$

Da die wirkliche Ammoniumsulfatkonzentration demnach ein wenig stärker ist als diejenige 0·358 n, von welcher wir in unseren Berechnungen ausgegangen sind, so ist eigentlich die Berechnung mit der wirklichen Konzentration als Ausgangspunkt zu wiederholen. Nun wird die Konzentration 0·370 n dem $S = 2·47$ entsprechen, was seinerseits wieder $z = 8·10$ und $y = 0·0262$ entspricht. Wiederholt man die Berechnung mit diesen Werten von z und y, ergibt sich, daß V_a und c praktisch genommen dieselben Werte wie oben erhalten.

Carlsberg. **8.** 32 [1909]), k_m die Dissoziationskonstante des Ammoniumhydroxydes $= 1·75 \,.\, 10^{\div 5}$ (18°) (Meddelanden fran K. Vetensk. Akad. *Nobel*-Inst. Nr. 8, 5 [1907]) und β_1 und β_2 die Dissoziationsgrade der ersten bezw. zweiten Ammoniumgruppe des Ammoniumsulfates bedeutet. Siehe Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** 68 ff. (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 104 (1918).

Mit diesen Voraussetzungen sind die Kurven der Fig. 22 durch Messung der Wasserstoffionenkonzentration von Lösungen genau bekannter Zusammensetzung berechnet, und mittels dieser Kurven ist man jetzt umgekehrt imstande, durch Messung der Wasserstoffionenkonzentration einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung von bekannter Zusammensetzung die von dem gegenwärtigen Albumin gebundene Menge überschüssiger Säure zu berechnen und damit auch den Gesamtgehalt der Lösung an freier Säure. Man hat nämlich die von der dispersen Phase festgehaltene Säure $= be$, die freie Säure des Dispersionsmittels $s = fh\ V_a$ und der Gesamtüberschuß folglich $= be + fh\ V_a = t$.

Wie schon gesagt, sind indessen die Voraussetzungen nicht ganz stichhaltig, indem sie die Annahme in sich verbergen, daß der amphotere Körper, das Eieralbumin, nicht in Ionen gespalten ist, was sich besonders in der Nähe des isoelektrischen Punktes merkbar macht.

Eine genaue Berechnung der Größe dieses Fehlers ist kaum möglich. Eine qualitative Schätzung desselben bekommt man indessen, wenn man sich vergegenwärtigt, daß das Eieralbumin ein ausgesprochen sauer reagierender Ampholyt ist und daß man deshalb von der Dissoziation in Hydroxyl- und Kationen absehen kann. Dann wird der Fehler der, daß man die überschüssige Säure t' des Dispersionsmittels (mit Vorzeichen gerechnet) zu hoch findet, indem die vom Albumin gelieferten Wasserstoffionen als aus der Säure entstanden betrachtet werden, und b demzufolge zu klein[1]); der Fehler wird um so größer, je kleiner die Proteinkonzentration ist, ist aber wie, gesagt, in den meisten Fällen zu vernachlässigen. Jedenfalls zeigen aber die Kurven, daß der isoelektrische Punkt, wo das Säurebindungsvermögen Null ist, bei $15 - 16 \times 10^{\div 6}$ liegen muß. Daß er wirklich da liegt, werden wir unten auf andere Weise zeigen.

e) Der isoelektrische Punkt.

Da, wie gesagt, die Bestimmung der überschüssigen Säure mittels der Kurven Fig. 22 in der Nähe des isoelektrischen Punktes versagt und andererseits eben diese Bestimmung von großem Interesse ist, so hat man hier einen anderen Weg eingeschlagen, der einen richtigen Wert des Gesamtüberschusses an Säure liefert, dagegen über die Verteilung zwischen den zwei Phasen nichts aussagt und im großen ganzen umständlicher ist. Man hat nämlich Lösungen bekannter Zusammensetzung untersucht und die Resultate derart geordnet, daß man teils den Proteingehalt und die Salzkonzentration

[1]) Die genaue Entwicklung siehe Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** 135 (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 179 (1918).

konstant gehalten hat, während der Säureüberschuß und damit die Wasserstoffionenkonzentration variiert hat, und teils ebenfalls bei konstantem Salzgehalt den Säureüberschuß pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff konstant gehalten, während man die Proteinkonzentration und d a m i t die Wasserstoffionenkonzen-

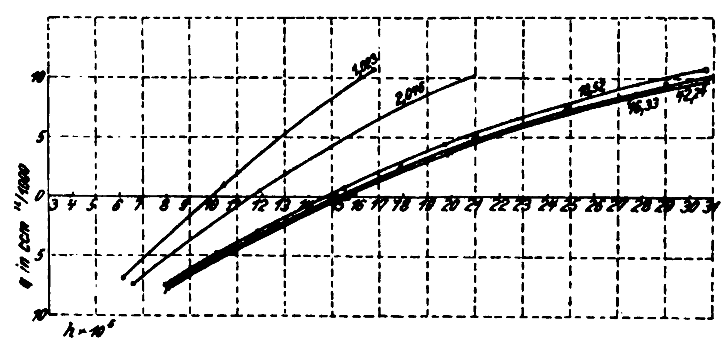


Fig. 26.

tration variiert hat. In dieser Weise sind zwei Arten von Kurvenscharen ausgearbeitet, von welcher hier zwei, die die gleiche Salzkonzentration, und zwar eine etwa 0·36 normale besitzen, wiedergegeben werden sollen.

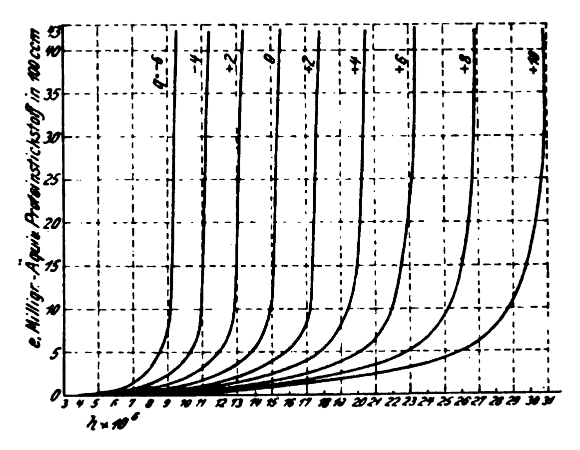


Fig. 27.

Auf Fig. 26 ist $q = t\,e$, d. h. die pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff anwesende überschüssige Säuremenge, Ordinat, während h Abszisse ist, und die verschiedenen Kurven für die bei denselben angeführten Proteinkonzentrationen gelten.

Auf Fig. 27 entspricht dagegen jede Kurve einem bestimmten bei derselben in cm^3 n/1000 angegebenen Wert von q, während die Proteinkonzentration als Ordinate und die Wasserstoffionenkonzentration wiederum als Abszisse auftreten.

Einmal im Besitz dieser Kurvenscharen und besonders der letzteren, können wir jetzt die Aufgabe lösen, den Gesamtgehalt, t, der Lösung an überschüssiger Säure aus einer Wasserstoffionenmessung zu berechnen, wenn die Salzkonzentration 0·36 n ist und wir die Proteinkonzentration kennen. Haben wir z. B. eine Lösung mit der Salzkonzentration 0·36 n und der Proteinkonzentration $e = 20$ und finden wir die Wasserstoffionenkonzentration $= 19 \times 10^{\div 6}$ dann gibt Fig. 27 unmittelbar, daß q zwischen $+2$ und $+4$ liegen muß, und eine Interpolationsrechnung gibt $q = 3{\cdot}14$. Das bedeutet, daß eine ammoniumsulfathaltige Eihydratlösung, die in bezug auf Ammoniumsulfat 0·36 n ist, deren Proteinkonzentration $e = 20$ ist und die eine Wasserstoffionenkonzentration $= 19 \times 10^{\div 6}$ besitzt, pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff eine überschüssige Menge Schwefelsäure von 3·14 cm^3 n/1000 und somit in 100 cm^3 in alles $t = 20 \times 3{\cdot}14 = 62{\cdot}8$ cm^3 n/1000 überschüssige Schwefelsäure enthalten wird.

Für andere Salzkonzentrationen bekommen die Kurvenscharen eine andere Lage, sind übrigens aber fast von identischer Form. Die Verschiebung ist indessen selbst für relativ größere Änderungen der Salzkonzentration, nicht groß, und es läßt sich deshalb, wenn man sich einige solchen Scharen für Salzkonzentrationen mit passenden Intervallen konstruiert hat, leicht auf beliebigen Konzentrationen interpolieren[1]).

Der Besitz dieser Kurvenschaaren ermöglicht es demnächst, den isoelektrischen Punkt des Eieralbumins zu bestimmen. Der isoelektrische Punkt eines Ampholyten zeichnet sich unter anderem dadurch aus, daß die Menge Säure, welche einer wässerigen oder salzhaltigen Lösung des betreffenden Ampholyten zugegeben werden muß, um der Flüssigkeit die isoelektrische Wasserstoffionenkonzentration beizubringen, von der gegenwärtigen Ampholytmenge unabhängig ist und folglich gleich derjenigen Menge, welche das reine Lösungsmittel verlangt, um die betreffende Reaktion anzunehmen[2]).

Der isoelektrische Punkt des Eieralbumins ist also derjenige, bei welchem Lösungen von verschiedenem Proteingehalt, aber mit konstantem Salzgehalt mit derselben Menge überschüssiger Säure versetzt werden müssen, um dieselbe Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten. Dieser Punkt läßt sich mittels der Kurvenschar der Fig. 26 folgendermaßen ermitteln: Wir suchen auf den Kurven die zusammengehörigen Werte von q und h und berechnen dann die entsprechenden Werte von t, indem $t = \frac{q \cdot e \cdot 100}{V_a}$ ist. In dieser

---

[1]) Siehe Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** 144 (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 189 (1918).

[2]) Siehe unter anderem *S. P. L. Sörensen*: Ergebnisse der Physiologie. Jahrg. 12, S. 503 (1912).

Weise bekommen wir für jede Proteinkonzentration eine Reihe zusammengehörige Werte von t und h, die in der Tabelle 7 zusammengestellt sind, h im ersten Stab, t_0, d. h. der Säureüberschuß, welcher die proteinfreie, 0·36 n Ammoniumsulfatlösung ($e = 0$) bei der betreffenden Wasserstoffionenkonzentration enthält, im zweiten. Stellen wir diese Werte von h und t graphisch zusammen, dann bekommen wir für jede Proteinkonzentration eine Kurve, und diese Kurven sollen einen gemeinsamen Punkt haben, den isoelektrischen Punkt des Albumins.

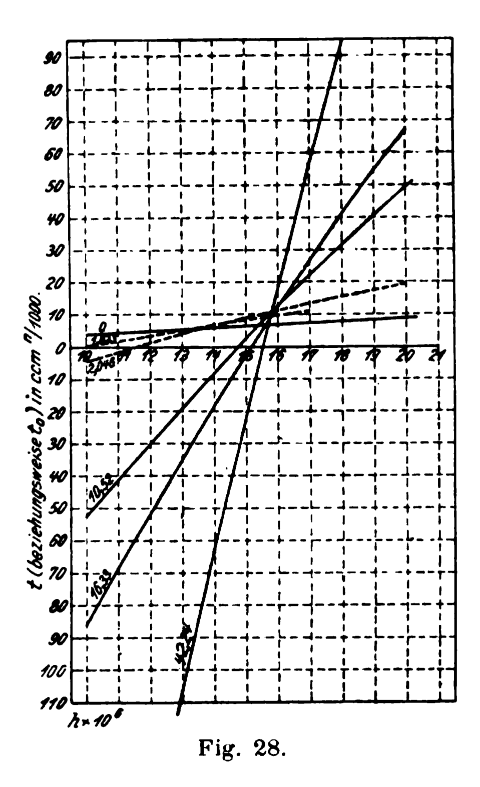


Fig. 28.

Fig. 28 enthält eine solche graphische Darstellung der Tabelle 7. Wir sehen, daß die verschiedenen Kurven sich zwar nicht genau in demselben Punkt schneiden, die Abweichung ist aber durch Versuchsfehler leicht erklärlich, und die Figur zeigt — davon abgesehen — unstreitbar, daß der isoelektrische Punkt zwischen $h = 15 - 16 \times 10^{-6}$ und die letztere Wasserstoffionenkonzentration am nächsten gelegen ist. Ähnliche Versuchsreihen mit anderen Konzentrationen des Ammoniumsulfates haben dasselbe Resultat ergeben, und als Mittel vieler solchen Reihen ist der Wert $h = 15{\cdot}74 \times 10^{-6}$ als die isoelektrische Reaktion des Eieralbumins festgesetzt worden.

Tabelle 7.

Die Abhängigkeit zwischen Wasserstoffionenkonzentration und überschüssiger Schwefelsäure (+) oder überschüssigem Ammoniak (÷) bei konstanter Konzentration des Ammoniumsulfates ($c = 0{\cdot}36$ n) und variierender Konzentration des Eieralbumins (e = die Anzahl Milligrammäquivalente Proteinstickstoff in 100 cm^3 Versuchsflüssigkeit).

q bedeutet die pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff gegenwärtige, überschüssige Menge von Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) in Kubikzentimeter n/1000.

V_a bedeutet das Volumen der in 100 cm^3 Versuchsflüssigkeit gegenwärtigen Menge Ammoniumsulfatlösung.

$t = \frac{q \cdot e \cdot 100}{V_a}$ wird deshalb die gesamte überschüssige Menge Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) in 100 cm^3 proteinfreier Ammoniumsulfatlösung.

Wasser-stoffionen-konzen-tration, h	$e = 0$ (protein-freie Am-monium-sulfatlösg.)	$e = 1{\cdot}023$, $V_a = 99{\cdot}91$		$e = 2{\cdot}046$, $V_a = 99{\cdot}82$		$e = 10{\cdot}52$, $V_a = 99{\cdot}06$		$e = 16{\cdot}33$, $V_a = 98{\cdot}54$		$e = 42{\cdot}24$, $V_a = 96{\cdot}23$	
$h \cdot 10^6$	t_0	q	t	q	t	q	t	q	t	q	t
10	3·84	0·18	0·18	÷2·20	÷4·51	÷4·95	÷52·57	÷5·22	÷86·50	÷5·53	÷242·71
11	4·33	1·90	1·95	÷0·86	÷1·76	÷3·86	÷40·99	÷4·15	÷68·77	÷4·45	÷195·31
12	4·81	3·60	3·69	0·55	1·13	÷2·80	÷29·74	÷3·10	÷51·37	÷3·42	÷150·10
13	5·29	5·20	5·32	1·88	3·85	÷1·78	÷18·90	÷2·10	÷34·80	÷2·40	÷105·34
14	5·76	6·82	6·98	3·10	6·36	÷0·78	÷8·28	÷1·10	÷18·23	÷1·42	÷62·32
15	6·22	8·30	8·50	4·32	8·86	0·22	2·34	÷0·18	÷2·98	÷0·50	÷21·95
16	6·69	9·70	9·93	5·50	11·28	1·18	12·53	0·72	11·93	0·40	17·56
17	7·15	11·00	11·26	6·55	13·43	2·10	22·30	1·62	26·84	1·30	57·06
18	7·61	—	—	7·60	15·58	3·00	31·86	2·48	41·09	2·12	93·05
19	8·06	—	—	8·55	17·53	3·85	40·89	3·30	54·68	2·98	130·79
20	8·52	—	—	9·45	19·37	4·65	49·38	4·08	67·61	3·75	164·59

f) Bestimmung des Schwefelsäuregehaltes der Kristalle.

Wenn man die Kristalle frei von Mutterlauge in reinem Zustand erhalten könnte, dann würde diese Bestimmung natürlich keine Schwierigkeiten darbieten. Man könnte die Säure entweder durch eine gewöhnliche Fällungsanalyse ermitteln oder man könnte, wie früher beschrieben, die Kristalle in Wasser lösen, die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung bestimmen und danach, mittels der früher gegebenen Kurven des Säurebindungsvermögens, den Schwefelsäuregehalt berechnen. Man kann ja indessen nur die Kristalle mit Mutterlauge gemischt erhalten, und diese Sachlage macht die Bestimmung der den Kristallen angehörigen Schwefelsäure recht umständlich. Das Verfahren verursacht aber sonst keinerlei Schwierigkeiten; es erfordert nur einige Wasserstoffionenmessungen nebst Analysen sowohl des Filtrates als auch der Kristalle mit anhaftender Mutterlauge, ganz wie es früher (S. 611 ff.) beschrieben ist.

Mittels derartiger Analysen und Wasserstoffionenmessungen kann nämlich der Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak, sowohl der des Filtrates als auch der der Kristalle mit anhaftender Mutterlauge ermittelt werden. Da man weiter, wie es oben (siehe S. 618) erwähnt wurde, voraussetzen darf, daß alles im Niederschlage mit anhaftender Mutterlauge gefundene Ammoniumsulfat von der anhaftenden Mutterlauge herrührt, so kann die Menge dieser letzteren und ihr Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak berechnet werden (siehe S. 649, Anm. 1); eine einfache Subtraktion gibt danach die überschüssige Menge Schwefelsäure oder Ammoniak, welche die von der Mutterlauge befreiten Kristalle enthalten. Zur näheren Erläuterung des Verfahrens werden wir die Einzelheiten ein paar Versuche betreffend anführen.

Als erstes Beispiel benützen wir den in der Tabelle 6 angeführten Versuch (Nr. 8 auf der Tabelle 1).

Analyse des Filtrates: Da 50 cm^3 56·359 g wägen und 100 g Filtrat 4·6966 g Ammoniakstickstoff (a_f) und 0·0235 g Proteinstickstoff (p_f) enthalten, so werden 100 cm^3 Filtrat 112·718 g wägen und 5·2939 g Ammoniakstickstoff ($c = 3·78$ n)[1]) und 0·0265 g Proteinstickstoff (1·89 Milligrammäquivalenten $= e$) enthalten. Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 11·27 . 10^{-6}$

Mittels einer der Fig. 27 analogen Kurvenschaar[2]), welche für die Ammoniumsulfatkonzentration $c = 2·79$ gelten, erhält man jetzt, daß für $e = 1·89$ und $h = 11·27 . 10^{-6}$ $q = + 2·0$ sein wird, indem q die Anzahl

---

[1]) Bei der Berechnung der Äquivalentkonzentration, c des Ammoniumsulfates ist hier wie in den folgenden Beispielen keine Rücksicht auf das Volumen des Eihydrates genommen, weil die betreffende Korrektion, bei den schwachen Proteinkonzentrationen, wovon in diesen Versuchen die Rede ist, mit den Versuchsfehlern verglichen, belanglos ist.

[2]) Siehe Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **12.** 143 (1917); Zeitschr. f. physiol. Chem. **103.** 189 (1918).



Kubikzentimeter n/1000-Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) in Überschuß pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff angibt. Aus einer analogen Schaar, l. c., deren Kurven für die Ammoniumsulfatkonzentration $c = 4{\cdot}12$ gelten, ergibt sich in derselben Weise, daß bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration q gleich $+ 5{\cdot}0$ wird, wenn $e = 1{\cdot}89$ und $h = 11{\cdot}27 . 10^{\div 6}$ ist. Da somit

$$c = 2{\cdot}79 \; q = + 2{\cdot}0 \text{ gibt und}$$
$$c = 4{\cdot}12 \; q = + 5{\cdot}0 \quad ,,$$

so bekommt man bei Interpolation, daß für $c = 3{\cdot}78$, die Ammoniumsulfatkonzentration des Filtrates, $q = + 4{\cdot}2$ wird. Der Überschuß an Schwefelsäure ist also $+ 4{\cdot}2 . 1{\cdot}89 = + 7{\cdot}94$ cm^3 n/1000 in 100 cm^3 Filtrat und $+ 7{\cdot}94 : 1{\cdot}12718 = + 7{\cdot}04$ cm^3 n/1000 in 100 g Filtrat.

Analyse des Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge ($N + M$), Probe I: Da 100 g ($N + M$) zufolge der Analyse 3·7563 g Ammoniakstickstoff (a_b) und 2·5834 g Proteinstickstoff (p_b) enthalten, so wird die abgewogene Probe I (Gewicht: 11·4526 g) und die daraus dargestellte Lösung (100 cm^3) 0·4302 g Ammoniakstickstoff ($c = 0{\cdot}31$ n) und 0·2959 g Proteinstickstoff (21·12 Milligrammäquivalent $= e$) enthalten. Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 14{\cdot}61 . 10^{\div 6}$.

Da nun sowohl die Kurven der Fig. 27 ($c = 0{\cdot}363$ n) als auch die Kurven einer analogen Figur ($c = 0{\cdot}062$ n) für $e = 21{\cdot}12$ und $h = 14{\cdot}61 \times 10^{\div 6}$ $q = \div 0{\cdot}5$ geben, so kann q auch für den zwischenliegenden Wert von c (0·31 n), der hier in Rede steht, gleich $\div 0{\cdot}5$ gesetzt werden. Die gesamte überschüssige Menge Schwefelsäure der Probe I ist deshalb $\div 0{\cdot}5 . 21{\cdot}12 = \div 10{\cdot}56$ cm^3 n/1000 (d. h. 10·56 cm^3 n/1000-Ammoniak).

Vorausgesetzt, daß die ganze Menge Ammoniakstickstoff (0·4302 g), die in Probe I gefunden wurde, von Ammoniumsulfat in anhaftender Mutterlauge herrührt[1]), wird das Gewicht letzterer $\frac{100 . 0{\cdot}4302}{4.6966} = 9{\cdot}1598$ g[2]) sein, worin 0·0022 g Proteinstickstoff (0·16 Milligrammäquivalenten), während die überschüssige Schwefelsäure laut der obenstehenden Analyse des Filtrates $+ 7{\cdot}04 . \frac{9{\cdot}1598}{100} = + 0{\cdot}64$ cm^3 n/1000 ausmacht.

Da ($N + M$) demgemäß in Probe I in allem $\div 10{\cdot}56$ cm^3 n/1000 und M für sich allein $+ 0{\cdot}64$ cm^3 überschüssige Schwefelsäure enthält, so wird N (der Niederschlag) $\div 10{\cdot}56 \div (+ 0{\cdot}64) = \div 11{\cdot}20$ cm^3 n/1000 überschüssiger Schwefelsäure oder pro Milligrammäquivalent $\frac{\div 11{\cdot}20}{21{\cdot}12 \div 0{\cdot}16} = \div 0{\cdot}53$ cm^3 enthalten.

Das Resultat ist also, daß die Kristalle in diesem Versuche 0·53 cm^3 n/1000 überschüssigen Ammoniak pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff enthalten haben.

Als zweites Beispiel wählen wir Versuch Nr. 14, Tabelle 1, wo das Auskristallisieren in einer etwas saureren Flüssigkeit stattgefunden hatte, weshalb die Berechnung sich ein wenig anders gestaltet:

---

[1]) Bei dieser Berechnung ist es natürlich erlaubt, von derjenigen kleinen Menge Ammoniak abzusehen, welche das Endresultat als Bestandteil der Kristalle aufweist, indem die ihr entsprechende Menge Stickstoff nur einen verschwindenden Bruchteil der ganzen gegenwärtigen Ammoniakstickstoffmenge ausmacht (in diesem Versuche z. B. nur etwa $^1/_{2700}$).

[2]) Das Gewicht der Kristalle wird demnach $11{\cdot}4526 \div 9{\cdot}1598 = 2{\cdot}2928$ g sein, und da der Proteinstickstoff der Kristalle $0{\cdot}2959 \div 0{\cdot}0022 = 0{\cdot}2937$ g ausmacht so wird der Proteinfaktor r, $\frac{2{\cdot}2928}{0{\cdot}2937} = 7{\cdot}807$ werden (vgl. Tabelle 6.)



Analyse des Filtrates: 100 cm^3 Filtrat wogen 112·013 g und enthielten 4·9221 g Ammoniakstickstoff ($c = 3·51\ n$) und 0·0617 g Proteinstickstoff (4·40 Milligrammäquivalente $= e$). Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 38·28 \,.\, 10^{\div 6}$.

Aus den Kurven der Fig. 22 erhellt es jetzt, daß b, welches die pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff gebundene Menge überschüssige Schwefelsäure in cm^3 n/1000 bedeutet, für $h = 38·28 . 10^{\div 6}$ in folgender Weise mit der Ammoniumsulfatkonzentration variiert:

$$c = 0·062;\ b = +\ 11·30,$$
$$c = 0·363;\ b = +\ 13·00,$$
$$c = 1·417;\ b = +\ 13·45,$$
$$c = 2·817;\ b = +\ 14·45.$$

Aus diesen Werten bekommt man durch graphische Extrapolation für $c = 3·51$, $b = +\ 15·00$ [1]).

Die ganze am Eihydrat in 100 cm^3 Filtrat gebundene Menge überschüssiger Schwefelsäure ist somit $+\ 15 \,.\, 4·40 = +\ 66·0$ cm^3 n/1000.

Weiter läßt sich die Konzentration s der überschüssigen Schwefelsäure im Dispersionsmittel durch Anwendung der Formel (siehe S. 641):

$s = h \,.\, f \div \frac{(x_{max})^2}{h \,.\, f}$ berechnen, welche Berechnung $s = 486 \,.\, 10^{\div 6}$ gibt,

woraus man wieder bekommt, daß die in 100 cm^3 Filtrat gegenwärtige, nicht an Eihydrat gebundene, überschüssige Menge Schwefelsäure 48·6 cm n/1000 ist, indem auch hier, wie oben, vom Volumen des Eihydrates abgesehen ist (siehe S. 648, Anm. 1).

Die Gesamtmenge überschüssiger Schwefelsäure in 100 cm^3 Filtrat wird deshalb: $+\ 66·0 +\ 48·6 = +\ 114·6$ cm^3 n/1000 und in 100 g Filtrat $+\ 114·6 : 1·12013 = +\ 102·31$ cm^3.

Analyse des Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge ($N + M$), Probe I: Da 100 g ($N + M$) laut der Analyse 3·4264 g Ammoniakstickstoff (a_b) und 2·7959 g Proteinstickstoff (p_b) enthalten, so wird die abgewogene Probe (Gewicht 6·5141 g) und die daraus dargestellte Lösung (100 cm^3) 0·2232 g Ammoniakstickstoff ($c = 0·159$ n) und 0·1821 g Proteinstickstoff (13·00 Milligrammäquivalente $= e$) enthalten. Die Wasserstoffionenmessung hat $h = 40·36 \,.\, 10^{\div 6}$ gegeben.

Auf den Kurven Fig. 22 ist zu ersehen, daß, wenn $h = 40·36 \,.\, 10^{\div 6}$ ist, so wird für

$$c = 0·062;\ b = +\ 12·02,$$
$$c = 0·363;\ b = +\ 13·85,$$
$$c = 1·417;\ b = +\ 14·35,$$
$$c = 2·817;\ b = +\ 15·45$$

sein.

Aus diesen Werten erhält man durch graphisches Interpolieren $b = +\ 13·38$ für $c = 0·159$.

Die 100 cm^3 Lösung werden somit in allem $+\ 13·38 \,.\, 13·00 = +\ 173.94$ cm^3 n/1000 überschüssige an Eihydrat gebundene Schwefelsäure enthalten.

Weiter berechnet man mittels der Formel

$$s = h \,.\, f \div \frac{(x_{max})^2}{h \,.\, f}$$

---

[1]) Dieser Wert von b kann, weil er durch Extrapolation gefunden ist, natürlich nicht besonders genau sein, was wieder bedingt, daß der Gehalt des Filtrates an überschüssiger Schwefelsäure auch nicht besonders genau bestimmt ist. Das bedeutet indessen nur wenig, weil — wie aus dem folgenden (siehe S. 651) sich ergibt — die aus der anhaftenden Mutterlauge stammende überschüssige Schwefelsäure nur etwa $^1/_{36}$ der gesamten im Niederschlage mit anhaftender Mutterlauge gegenwärtigen Menge überschüssiger Schwefelsäure ausmacht.

daß die 100 cm^3 Lösung der Probe I von nicht an Eihydrat gebundener überschüssiger Schwefelsäure + 12·85 cm^3 n/1000 enthalten.

Schließlich bekommt man in derselben Weise und unter derselben Voraussetzung wie im ersten Beispiel, daß das Gewicht der den Kristallen anhaftenden Mutterlauge $\frac{100 \,.\, 0·2232}{4·3942} = 5·0794$ g[1]) ausmacht, worin 0·0028 Proteinstickstoff (0·20 Milligrammäquivalente), während die überschüssige Schwefelsäure laut der obenstehenden Analyse

$$+ 102·31 \times \frac{5.0794}{100} = + 5·20 \; cm^3 \; n/1000$$

beträgt.

Da demnach $(N + M)$ in Probe I in allem + 173·94 + 12·85 = + 186·79 n/1000 überschüssige Schwefelsäure enthält, und da M für sich allein + 5·20 cm^3 enthält, so wird N + 186·79 ÷ 5·20 = + 181·59 cm^3 n/1000 überschüssige Schwefelsäure oder pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff $\frac{+ 181·159}{13·00 \div 0·20} =$ = + 14·19 cm^3 enthalten.

Das Resultat ist somit, daß die Kristalle in diesem Versuche 14·19 cm^3 n/1000 überschüssige Schwefelsäure pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff enthalten haben.

Auf einem der beiden Wege, welche bei den oben ausführlich besprochenen Beispielen befolgt wurden, ist der Gehalt der Kristalle an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak in allen in der Tabelle 1 mitgeteilten Versuchen berechnet, ebenso wie in ein paar anderen dafür geeigneten Versuchen, bei welchen das analytische Verfahren indessen nicht hinlänglich genau war, um den Faktor r aus den Ergebnissen zu berechnen. Die Resultate dieser Berechnungen finden sich in der Tabelle 8 zusammengestellt.

Die ersten 14 Versuchsnummern entsprechen denselben Nummern der Tabelle 1. Der zweite, dritte und vierte Stab der Tabelle enthalten Erläuterungen über die Zusammensetzung und Wasserstoffionenkonzentration des Filtrates, während die vier letzten Stäbe den für die Kristalle berechneten Gehalt an Schwefelsäure oder Ammoniak im Überschuß enthalten. Die Fig. 29 gibt diese Resultate in graphischer Form wieder, indem die Wasserstoff-

---

[1]) Das Gewicht der Kristalle wird demzufolge 6·5141 ÷ 5·0794 = 1·4347 g sein, und da der Proteinstickstoff der Kristalle 0·1821 ÷ 0·0028 = 0·1793 g ausmacht, so wird der Proteinfaktor, r, $\frac{1·4347}{0·1793} = 8·002$ werden (vgl. Tabelle 1). Dieser Wert von r entspricht indessen nicht nur dem Wassergehalt der Kristalle, sondern umfaßt zugleich den Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure. Da nun letzterer 14·19 cm^3 n/1000 (= 0·696 mg Schwefelsäure) pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff (= 14·01 mg Stickstoff) ausmacht, so wird der dementsprechende Faktor $\frac{0·696}{14·01} = 0·050$ sein; der korrigierte Wert von r wird deshalb $8·002 \div 0·05_0 = 7·95_2$.

Tabelle 8.

Der Gehalt der Kristalle an Schwefelsäure oder Ammoniak im Überschuß.

Versuchsnummer	Gehalt an Proteinstickstoff in Milligrammäquivalent, e, in 100 cm^3	Ammoniumsulfatäquivalentkonzentration, c	Wasserstoffionenkonzentration, h	Die Kristalle enthalten m cm^3 n/1000 Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) im Überschuß pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff			
	des Filtrates			Probe I	Probe II	Probe III	Mittel von
	e	c	$h \times 10^6$	m	m	m	m
1	18·32	3·78	15·13	+ 0·44	+ 1·20	+ ·11	+ 0·92
2	2·54	3·77	11·02	÷ 1·44	÷ 1·08	÷ 1·01	÷ 1·18
3	1·22	3·90	11·13	÷ 1·63	÷ 1·54	÷ 1·59	÷ 1·59
4	1·30	3·90	12·06	÷ 1·34	÷ 1·54	÷ 1·46	÷ 1·45
5	4·52	3·74	11·37	÷ 0·51	÷ 0·61	÷ 0·72	÷ 0·61
6	2·74	3·73	12·15	÷ 1·00	÷ 1·22	÷ 1·39	÷ 1·20
7	3·03	3·83	12·46	÷ 0·78	÷ 0·54	÷ 0·79	÷ 0·70
8	1·89	3·78	11·27	÷ 0·53	+ 0·15	÷ 0·43	÷ 0·27
9	2·76	3·76	12·04	÷ 0·03	÷ 0·13	÷ 0·23	÷ 0·13
10	32·47	3·22	10·00	÷ 4·76	÷ 4·75	÷ 4·76	÷ 4·76
11	8·77	3·52	9·73	÷ 6·53	÷ 6·56	÷ 6·51	÷ 6·53
12	0·33	4·43	8·29	÷ 10·22	÷ 10·36	—	÷ 10·29
13	9·91	3·49	10·57	÷ 2·78	÷ 2·79	÷ 2·78	÷ 2·78
14	4·40	3·51	38·28	+ 14·19	+ 14·25	+ 14·14	+ 14·19
15	1·18	3·89	11·85	÷ 1·53	÷ 1·44	÷ 1·77	÷ 1·58
16	1·63	3·88	11·45	÷ 1·69	÷ 0·96	÷ 1·25	÷ 1·30
17	4·21	3·48	27·29	+ 8·63	+ 8·59	+ 8·59	+ 8·60
18	6·10	3·49	17·34	+ 2·66	+ 2·68	+ 2·63	+ 2·66

ionenkonzentration, *h*, als Abszisse und der Wert von *m* (letzter Stab der Tabelle 8) als Ordinate fungieren.

Durch die solchermaßen festgelegten Punkte ist eine Kurve gezeichnet, welche demnach die Abhängigkeit des Gehaltes der ausgeschiedenen Kristalle an Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak von der Wasserstoffionenkonzentration der Mutterlauge (des Filtrates) versinnlicht. Es ist zwar höchst wahrscheinlich, daß auch andere Faktoren als die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrates, z. B. die Ammoniumsulfatkonzentration desselben in der hier erwähnten Beziehung von Bedeutung sind, es geht aber aus den Versuchsergebnissen deutlich hervor, daß die Wasserstoffionenkonzentration weitaus der wichtigste Faktor ist und wir haben deshalb keinen Anstand genommen, alle Versuchsresultate durch eine gemeinsame Kurve wiederzugeben.

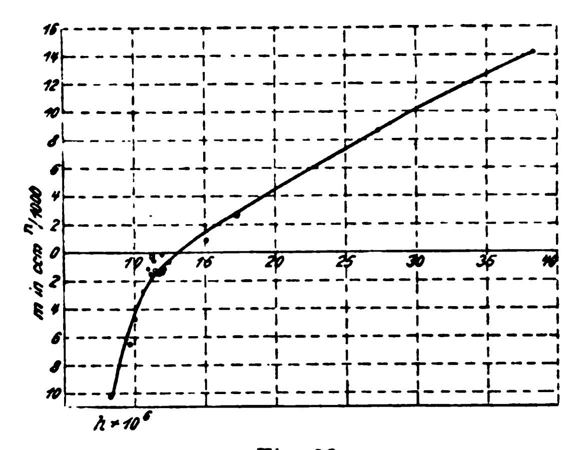


Fig. 29.

Aus Fig. 29 geht hervor, daß nur, wenn die Mutterlauge eine Wasserstoffionenkonzentration von etwa $13 \times 10^{\div 6}$ besitzt, die ausgeschiedenen Eieralbuminkristalle weder Schwefelsäure noch Ammoniak in Überschuß enthalten werden. Bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen als zirka $13 \times 10^{\div 6}$ werden die Kristalle Schwefelsäure und bei niedrigeren Ammoniak enthalten, und zwar um so mehr von diesen Stoffen, je höher bezw. je niedriger die Wasserstoffionenkonzentration ist.

Vergleicht man die Kurve der Fig. 29 mit denjenigen der Fig. 22, so sieht man auf den ersten Blick, daß man es in beiden Fällen mit Kurven von ungefähr derselben Form zu tun hat. Da nun die Kurven der Fig. 22 die Abhängigkeit zwischen der Wasser-

stoffionenkonzentration einerseits und der vom gelösten Eihydrat gebundenen überschüssigen Menge Schwefelsäure oder Ammoniak andererseits versinnlichen, während die Kurve der Fig. 29 die Abhängigkeit der durch das auskristallisierte Eieralbumin gebundenen überschüssigen Menge Schwefelsäure oder Ammoniak von der Wasserstoffionenkonzentration zeigt, so liegt die Folgerung nahe, daß das Auskristallisieren nur bedeutet, daß die disperse Phase sich in fester Form ausscheidet mit derselben Zusammensetzung oder jedenfalls mit demselben Gehalt an Schwefelsäure oder Ammoniak im Überschuß, wie sie schon in der Lösung besitzt und diese Folgerung ist denn auch im großen und ganzen richtig.

Eine eingehendere Betrachtung, auf deren Einzelheiten hier verzichtet werden muß, zeigt indessen, daß der genaue Ausdruck der Sachlage sich folgenderweise formulieren läßt:

Bei einer Wasserstoffionenkonzentration von zirka $13 \times 10^{\div 6}$ wird das Eihydrat in der Lösung vor der Kristallisation weder Schwefelsäure noch Ammoniak im Überschuß enthalten und dasselbe wird mit den bei dieser Wasserstoffionenkonzentration ausgeschiedenen Kristallen der Fall sein. Etwas anders liegt die Sache, wenn die Wasserstoffionenkonzentration wesentlich höher oder niedriger als etwa $13 \times 10^{\div 6}$ ist, indem die bei höheren Wasserstoffionenkonzentration ausgeschiedenen Kristalle ein bischen weniger überschüssige Schwefelsäure als das Eihydrat vor dem Kristallisieren enthalten, während die bei niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeschiedenen Kristalle ein bischen weniger überschüssiges Ammoniak enthalten, als das Eihydrat vor der Kristallisation.

Im großen und ganzen muß man indessen damit rechnen, daß das Eisulfat mit weitaus dem wesentlichsten Teil des Überschusses an Schwefelsäure oder Ammoniak, welchen es vor der Kristallisation enthält, auskristallisiert[1]) und daher kommt es,

[1]) In gutem Einklang damit findet man auch, daß die Wasserstoffionenkonzentration sich während der Kristallisation nur wenig ändert. Der Untersuchung dieser Frage ist eine Reihe von Versuchen gewidmet, bei welchen die Eieralbuminlösung mit angemessenen Mengen von Schwefelsäure oder Ammoniak und danach mit Ammoniumsulfat bis zur bleibenden Unklarheit versetzt worden ist. Danach ist filtriert und das klare Filtrat mit einem Tropfen Impfungsmaterial versetzt, wonächst die Lösung in das Elektrodengefäß gebracht und die Wasserstoffionenkonzentration sowohl



daß das kristallisierte Eieralbumin selbst nach wiederholten Umkristallisationen wechselnde Mengen von Schwefelsäure oder Ammoniak enthält. Es muß nämlich (siehe S. 674) gewissermaßen geschätzt werden, wie viel Schwefelsäure bei der ersten Kristallisation zugesetzt werden muß; aber hieraus folgt wieder, daß die Wasserstoffionenkonzentration und damit die vom Eihydrat gebundene Menge von Schwefelsäure oder Ammoniak im Überschuß nicht immer bei der ersten Kristallisation des Eisulfates dieselbe ist. Da nun Eisulfatkristalle mit z. B. viel überschüssiger Schwefelsäure eine Lösung mit großer Wasserstoffionenkonzentration geben werden, aus welcher das Eisulfat sich bei der Umkristallisation wieder mit einem reichlichen Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure ausscheidet, so ist leicht zu verstehen, daß selbst wiederholte Umkristallisationen nur zum Teil die Verschiedenheiten auszugleichen vermögen, welche von den nicht immer identischen Bedingungen der ersten Kristallisation stammen.

Um dies näher zu beleuchten, werden wir nur ein paar ganz einfache Versuche mitteilen.

Bei den Versuchen Nr. 13, 14, 17 und 18 (Tabelle 1) wurden die nach der Probenahme zurückbleibenden Reste des Niederschlages mit einer Ammoniumsulfatlösung gewaschen, deren Konzentration in der gewöhnlichen Weise (siehe S. 674) bestimmt wurde und die keinen Überschuß weder von Schwefelsäure noch von Ammoniak enthielt. Danach wurden die Niederschläge jeder für sich in Wasser gelöst und aus den Lösungen das Eisulfat wieder durch Zusatz von Amoniumsulfat ausgeschieden. Nach einigen Tagen wurde filtriert, die Niederschläge gewaschen und gelöst und die Kristallisation zum drittenmal wiederholt. In den solchermaßen erhaltenen Mutterlaugen gab die Messung der Wasserstoffionenkonzentration die unten angeführten Resultate, welche des Vergleiches wegen mit der Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate von der ersten Kristallisation (siehe Tabelle 1) zusammengestellt sind:

	$h \times 10^6$	
	Erste Mutterlauge	Dritte Mutterlauge
Nr. 13	10·57	10·38
„ 18	17·34	15·71
„ 17	27·29	24·16
„ 14	38·28	31·77

---

sofort als auch zu wiederholtenmalen während des Kristallisierens gemessen. Als Beispiele der Versuchsresultate können angeführt werden:

$h \,.\, 10^6$	
sofort	nach reichlicher Kristallisation
43·7	43·3
28·2	27·7
19·9	18·3
16·2	14·4
8·9	6·9
4·0	2·9

Die Zahlen zeigen, daß die Wasserstoffionenkonzentration während der Kristallisation ein wenig kleiner wird, und diese Abnahme ist — wie nach dem oben Angeführten zu erwarten war — verhältnismäßig am größten bei den kleineren Wasserstoffionenkonzentrationen.

Die Versuche mit den kleinen Konzentrationen der Wasserstoffionen zeigen somit keine oder nur eine kleine Verschiebung von der ersten zu der dritten Mutterlauge, wogegen die Versuche mit hoher Wasserstoffionenkonzentration eine deutliche Abnahme dieser von der ersten zu der dritten Kristallisation zeigen. Andererseits zeigen die Zahlen ebenso unverkennbar, daß die Kristalle des Versuches 14 gewiß viele Male umkristallisiert werden mußten, wenn es gelingen sollte, den großen Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure auf diesem Wege zu beseitigen.

Es ist indessen oben (S. 604) gesagt worden, daß die Kristalle normal 1 Äquivalent Schwefelsäure auf 125 Äquivalent Proteinstickstoff enthalten. Diese Aussage ist auf den folgenden Überlegungen basiert:

Unter den Faktoren, welche den Zustand des Gleichgewichtes zwischen dem auskristallisierten Niederschlag und der umgebenden Mutterlauge bestimmen, ist die Wasserstoffionenkonzentration — wie es schon oben erwähnt ist — von wesentlicher Bedeutung. Wenn es beim Auskristallisieren des Eieralbumins sich um die Kristallisation des Ampholyten selbst, des Eihydrates, ohne überschüssige Schwefelsäure oder überschüssiges Ammoniak handelte, dann müßte man, wie es besonders von *Michaëlis*[1]) betont worden ist, erwarten, daß das Kristallisationsoptimum bei einer dem isoelektrischen Punkte des Albumins entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration zu finden war. Es zeigte sich aber, daß dies nicht der Fall ist, indem der isoelektrische Punkt des Eieralbumins bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $15 \cdot 7 . 10^{\div 6}$, dem $p. = 4 \cdot 80$ entsprechend, liegt, während das Optimum der Kristallisation laut der Kurven (Fig. 18) bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $26 - 27 . 10^{\div 6}$, dem $p. = 4 \cdot 58$, liegt. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration auskristallisiert enthält indessen das Eieralbumin greifbare Mengen überschüssiger Schwefelsäure, welche, wie Fig. 29 (siehe S. 653) zeigt, etwa 8 cm^3 n/1000-Schwefelsäure auf ein Milligrammäquivalent Proteinstickstoff, somit **1 Äquivalent Schwefelsäure auf 125 Äquivalente Proteinstickstoff**, betragen. Es kann deshalb kaum in Zweifel gestellt werden, daß in diesem Falle, wo die Kristallisationsbedingungen am günstigsten sind, ein Eieralbuminsulfat auskristallisiert und es ist dann höchst wahrscheinlich, daß der auskristallisierte Niederschlag immer schwefelsäurehaltig ist. Dieses steht in keiner Weise im Gegensatz zu den bezüglich des Gehaltes der Kristalle an überschüssiger Schwefelsäure bezw. Ammoniak oben angegebenen und in Fig. 29 (S. 653) graphisch dargelegten Befunden.

Betrachtet man nämlich den Schwefelsäuregehalt des beim Kristallisationsoptimum ($26 - 27 . 10^{\div 6}$) auskristallisierten Nieder-

[1]) Biochem. Zeitschr. **30**. 143 (1910; **47**. 250 (1912); *L. Michaëlis*: Die Wasserstoffionenkonzentration. S. 44 (1914).



schlages als den normalen, so zeigt Fig. 16, daß Niederschläge, welche bei Wasserstoffionenkonzentrationen größer als die optimalen auskristallisiert sind, etwas Schwefelsäure, während bei schwächeren Wasserstoffionenkonzentrationen auskristallisierte Niederschläge ein wenig Ammoniak mitgenommen haben. Weiter ist diese Änderung der Zusammensetzung der Kristallmasse von einer Änderung der Löslichkeit begleitet, indem die beim Kristallisieren unter sonst identischen Bedingungen in der Lösung bleibende Menge Eihydrat mit der Entfernung von der optimalen Wasserstoffionenkonzentration stark ansteigt, gleichgültig in welcher Richtung diese Entfernung stattfindet. Das Verhältnis ist also ein ganz ähnliches, wie z. B. bei der Fällung einer Aluminiumsulfatlösung mittels einer Natriumhydroxydlösung. Das wesentliche Produkt dieser Fällung ist Aluminiumhydroxyd, die Vollständigkeit der Fällung und die Zusammensetzung des Niederschlages sind aber vom Mengenverhältnis der reagierenden Stoffe im höchsten Grad abhängig. Wird ein Unterschuß von Natriumhydroxyd zugegeben, so ist die Fällung unvollständig und der Niederschlag enthält Schwefelsäure, während Überschuß von Natriumhydroxyd bewirken wird, daß ein Teil des Niederschlages als Natriumaluminat gelöst und der ungelöste Rest alkalihaltig wird.

g) Die Bestimmung des osmotischen Druckes.

Diese Bestimmung läßt sich am bequemsten in der Weise ausführen, daß man in einem offenen Osmometer einen Druck auf die Innenflüssigkeit ausübt und ermittelt, wie groß dieser Druck sein muß, um den osmotischen Druck gerade zu kompensieren, d. h. man ermittelt den Druck, bei welchem das Flüssigkeitsvolum im Osmometer weder zu- noch abnimmt.

1. Der benützte Apparat und das gebrauchte Verfahren.

Auf der Fig. 30 ist der angewandte Apparat schematisch dargestellt. Das Osmometer besteht aus einem Kollodiumhäutchen *A*, welches an einem Glaskragen *B* angebracht ist, in dessen Hals ein geschliffenes Glasrohr absolut wasserdicht hineinpaßt. Dieses verjüngt sich etwas über dem Schliff in einem Kapillarrohr, welches, mit einer Marke auf dem Glaskragen als Nullpunkt, in Millimeter geteilt ist. Das Kapillarrohr ist mit einem Glashahn *C* versehen, mittels welchen der Raum unter demselben abgesperrt werden kann (siehe übrigens die eingehendere Beschreibung der Einzelheiten und der Benützung des Osmometers (S. 663).

Das Osmometer ist nebst einem elektrisch getriebenen Rührapparat *D* und einem *Beckmann*schen Thermometer *E* in einem

unversilberten *Dewar*schen Gefäß angebracht, welches letztere seinerseits in einem Zylinderglas *F* steht, das in einen auf der Figur nicht aufgenommenen, gut regulierten Wasserthermostaten eingesenkt ist (siehe weiter S. 665).

Das Osmometer kann mittels eines Kautschukschlauches *G* mit dem Gegendruckapparat luftdicht verbunden werden; die Anwendung des letzteren geht aus der Figur unmittelbar hervor. Hebt oder senkt man den Behälter *H*, der mittels eines Kautschukschlauches mit einem Behälter *I* verbunden und wie letzterer teilweise mit Wasser gefüllt ist, so ändert man den Druck über der Oberfläche des Wassers in *I* und damit auch den Gegendruck im Osmometer in entsprechender Weise. Die Größe des Druckes liest sich in jedem gegebenen Augenblick dem Manometer *M* ab, welches Wasser enthält und mit einem in der Figur nicht gezeichneten Maßstab versehen ist.

Wenn eine Messung zur Ausführung vorliegt, bringt man die Proteinlösung, deren osmotischer Druck zu ermitteln ist, in das Osmometer in der Weise, daß dasselbe bis etwa über dem Hahn *C* vollständig damit gefüllt ist (die „Innenflüssigkeit" über das Füllen siehe S. 663), während so viel „Außenflüssigkeit" ins *Dewar*-Gefäß gebracht wird, daß dieselbe eben an die Nullmarke des Kragens *B* reicht.

Diese Außenflüssigkeit muß von solcher Beschaffenheit sein, daß sie soweit als möglich dieselbe Zusammensetzung wie das Dispersionsmittel der Innenflüssigkeit hat, damit die diffusiblen Bestandteile der Innen- und Außenflüssigkeit unter sich im „Diffusionsgleichgewicht" stehen (siehe des näheren S. 666).

Verbindet man jetzt das Osmometer — der Hahn *C* offen — mit dem Gegendruckapparat und gibt man durch Heben oder Senken von *H* einen Gegendruck p_m, in Zentimetern Wassersäule gemessen, auf der Oberfläche der Proteinlösung in der Osmometerkapillaren und ist der Druck, welcher vom Niveauunterschied zwischen der Innen- und Außenflüssigkeit herrührt, p_e (in Zentimetern Wasserdruck unter gehöriger Rücksicht auf das spezifische Gewicht der Proteinlösung und der kapillaren Steighöhe umgerechnet [siehe weiter S. 665]), so wird der gesamte Gegendruck $p_m + p_e$ sein. Hat jetzt die Außenflüssigkeit die richtige Zusammensetzung, so werden, wie schon genannt, die Außen- und Innenflüssigkeit in „Diffusionsgleichgewicht" stehen und der osmotische Druck der letzteren wird dann demjenigen gesamten Gegendruck gleich sein, welcher erforderlich ist, um dem System das vollständige Gleichgewicht beizubringen, so daß der Meniskus der Osmometerkapillaren weder steigt noch sinkt. Die Messung, die also bezweckt denjenigen Gesamtgegendruck zu bestimmen, bei

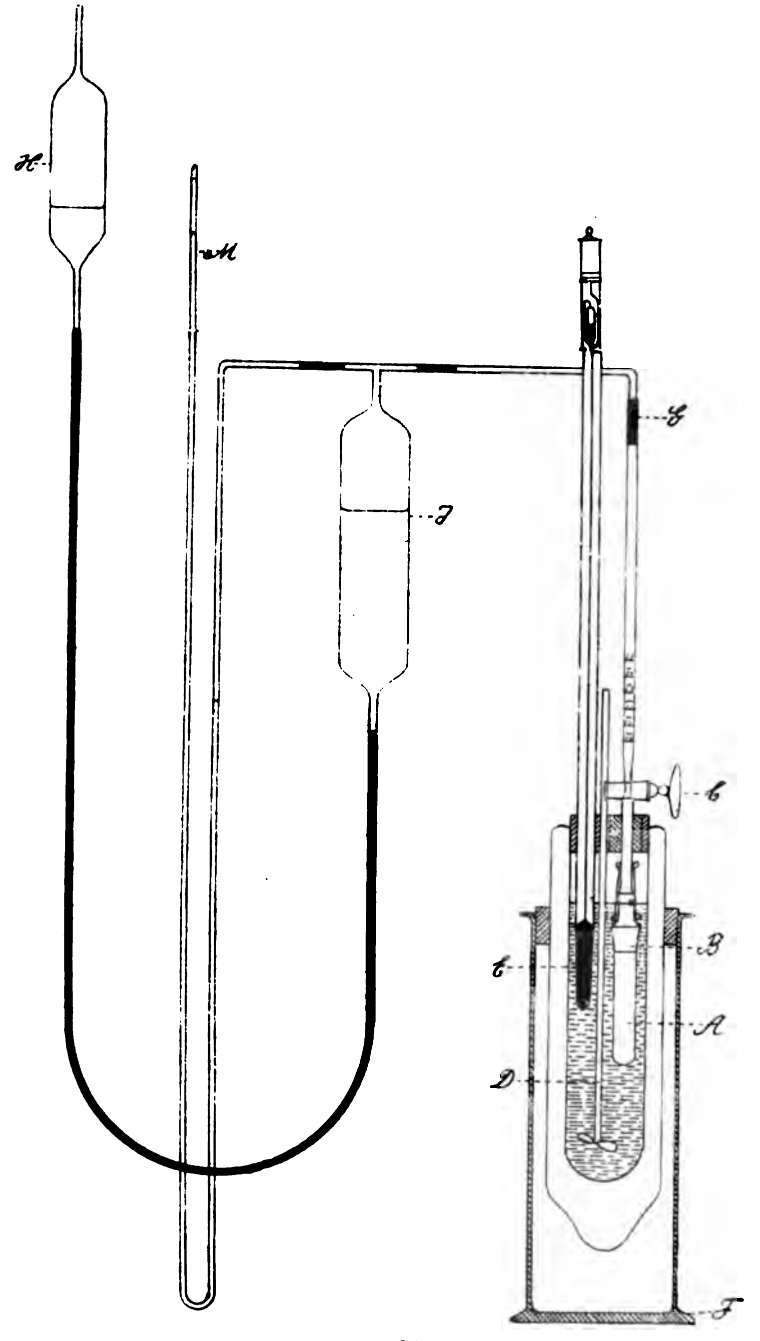


Fig. 30.

welchem der Meniskus unbeweglich bleibt, kann sofort vorgenommen werden, wenn nur die Außenflüssigkeit die absolut richtige Zusammensetzung besitzt. Gewöhnlich wird dies aber nicht der Fall sein. Man tut deshalb am besten, sobald das Osmometer an seinen Platz gebracht und die Außenflüssigkeit zur Nullmarke ausgefüllt ist, den Hahn C zu schließen und bis zum nächsten Tag zu warten, um ein vollständiges „Diffusionsgleichgewicht“ zwischen der Innen- und der Außenflüssigkeit zu erreichen und erst dann den Hahn C zu öffnen und die Messung auszuführen.

Die Messung an sich betreffend hat es sich gezeigt, daß die Geschwindigkeit, mit welcher der Meniskus in den Osmometerkapillaren steigt und sinkt, mit der Differenz zwischen dem angewandten Gesamtgegendruck und dem osmotischen Druck proportional ist, jedenfalls solange diese Differenz nicht allzu groß ist. Es gilt deshalb die Geschwindigkeit zu messen, mit welcher der Meniskus sich bei einem gegebenen Gegendruck bewegt. Um die Methode möglichst genau und möglichst wenig zeitraubend zu gestalten, werden die Änderungen der Stellung des Meniskus mittels eines Ablesemikroskops abgelesen, welches mit einer Mikrometerteilung versehen ist (die Einteilung der letzteren war eine solche, daß 33·8 der kleinsten Teilstriche einem Millimeter entsprechen).

Stellt es sich jetzt heraus, daß der Meniskus beim Gegendruck p_1 im Laufe einer gegebenen Zeit, z. B. zehn Minuten, um v_1 Mikrometerteilstriche steigt und bei einem Gegendruck p_2 in dem gleichen Zeitraum um v_2 Teilstriche steigt und nennt man den osmotischen Druck P, so wird:

$$\frac{P \div p_1}{v_1} = \frac{P \div p_2}{v_2} = \frac{p_1 \div p_2}{v_2 \div v_1} = \alpha.$$

Der Wert von α ist natürlich vom Querschnittsareal der Kapillare abhängig, ist aber eine für jedes Kollodiumhäutchen charakteristische, von der Permeabilität und dem Oberflächenareal des Häutchens abhängige Größe, welche mit der Zeit nur wenig variiert und *welche denjenigen Größer- oder Minderdruck angibt, welcher vonnöten ist, um den Meniskus während zehn Minuten einen Mikrometerstrich zu verschieben.* α läßt sich, wie es die Formel anzeigt, mittels zwei Messungen bestimmen und mittels α kann sodann P aus einer einzelnen Messung berechnet werden, indem

$$P \div p_1 = \alpha \cdot v_1$$
$$P = p_1 + \alpha \cdot v_1$$

Ist die Verschiebung während t Minuten u Teilstriche gewesen, wird sie in zehn Minuten natürlich $10 \cdot \frac{u}{t}$ ausmachen, und obiger Ausdruck erhält deshalb die allgemeine Form:

$$P = p + \alpha \cdot 10 \cdot \frac{u}{t} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad 1).$$

wo p die Summe p_m und p_e ist.

Wird u mit Vorzeichen gerechnet, so daß ein Steigen in den Osmometerkapillaren positiv, ein Fallen negativ gerechnet wird, so kann man mittels der Formel 1) den osmotischen Druck aus irgendeiner einzelnen Messung berechnen.

Stellt man eine Reihe von Messungen graphisch zusammen, indem man die angewandten Gegendrucke (p_1, p_2 usw.) als Abszissen und die beobachteten Verschiebungen des Meniskus pro zehn Minuten (v_1, v_2 usw.) als Ordinaten benützt, so müssen die gefundenen Punkte, wenn unsere Voraussetzungen stichhaltig sind, und wenn die Innen- und die Außenflüssigkeit wirklich im „Diffusionsgleichgewicht" sind, auf einer Geraden liegen, deren Schnittpunkt mit der Abszissenachse den osmotischen Druck P gibt, indem dieser Gegendruck der Verschiebung o entsprechen wird. Man ersieht leicht, daß auch der Wert von α bestimmt ist, sobald jene Gerade gezogen ist. Diese graphische Methode ist ein bischen umständlicher als die Benützung der Formel 1), sie liefert aber eine vortreffliche Übersicht über die Übereinstimmung der einzelnen Messungen untereinander.

Die Genauigkeit der Methode hängt in hohem Maß davon ab, daß die Temperatur während der Messung konstant erhalten wird, da das Osmometer widrigenfalls wie ein Thermometer wirken wird. Man muß deshalb für eine möglichst gute Temperaturkonstanz Sorge tragen, indem man, wie schon oben gesagt, das Osmometer in ein *Dewar*-Gefäß anbringt, welches seinerseits in einem sorgfältig eingestellten Thermostaten steht. Außerdem erlaubt das *Beckmann*sche Thermometer der Außenflüssigkeit die Ablesung von Tausendstelgraden und die Temperatur läßt sich mit Leichtigkeit derart regulieren, daß die Änderung derselben in der Außenflüssigkeit des Osmometers während mehrerer Stunden nur einige wenige Tausendstelgrade beträgt.

Übrigens läßt sich die von der Temperaturänderung herrührende Korrektion leicht berechnen, wenn man das Querschnittareal der Kapillare s, den Ausdehnungskoeffizient der betreffenden

Flüssigkeit δ und das gesamte innere Volumen des Osmometers r kennt, indem die Korrektion pro Tausendstelgrad k_τ, dann

$$k_\tau = r\,\delta/1000\,s\ ^{1)}$$

wird, und die Korrektion der einzelnen Messung bekommt man einfach durch Multiplizieren der in Tausendstelgraden ausgedrückten Temperaturänderung mit k_τ. Auch hier muß man natürlich mit Vorzeichen rechnen und es ist leicht einzusehen, daß, wenn die von einer während der Messung eingetretenen Temperatursteigerung herrührende Korrektion positiv gerechnet wird, dieselbe von der direkt gemessenen Verschiebung des Meniskus zu subtrahieren ist. Bezeichnen wir jetzt diese letztere mit h (in den Einheiten der Mikrometerskala ausgedrückt und eine Steigerung positiv gerechnet) und die Temperaturänderung während der Messung mit τ (in Tausendstelgraden und die Temperatursteigerung positiv gerechnet), so haben wir

$$h \div k_\tau\,.\,\tau = u.$$

Es ist dieser wegen der Temperaturänderung korrigierte Wert u, der Verschiebung des Meniskus, welcher in die Formel 1) (S. 661) eingeht.

Nach der Ausführung der letzten Einzelmessung, bei welcher immer dafür Sorge getragen werden muß, daß die Innenflüssigkeit eine geraume Zeit, am liebsten ein paar Stunden, unter eben demjenigen Gegendruck steht, welcher dem osmotischen Druck entspricht, werden zur Analyse Proben sowohl der Innen- als auch der Außenflüssigkeit entnommen. Der Hahn C wird geschlossen, das Osmometer aus der Außenflüssigkeit herausgenommen und danach der Oberteil des Osmometers abgenommen; jetzt wird möglichst schnell zirka 5 cm^3 der Innenflüssigkeit herauspipettiert und gewogen, während der übergebliebene Teil derselben ausgegossen und für Wasserstoffionenmessungen verwendet wird. Zuletzt werden Proben der Außenflüssigkeit entnommen und gewogen und dieselben sowie die Proben der Innenflüssigkeit analysiert, indem nach dem früher beschriebenen Verfahren (siehe S. 611 ff.) ihr Gehalt an Ammoniak- und Proteinstickstoff bestimmt wird. Schließlich bestimmt man in 100 cm^3 der Außenflüssigkeit den Inhalt sowohl an „koagulablem“ als an „nicht koagulablem“ Stickstoff.

---

[1]) Diese Berechnung ist nicht ganz richtig, indem sie nicht berücksichtigt, daß derjenige Teil des Kapillarrohres, welcher sich über dem *Dewar*-Gefäß befindet, eine andere Temperatur haben und während der Messung eine andere Temperaturänderung erleiden kann als diejenige, die das *Beckmann*-Thermometer anzeigt. Da es sich hier indessen nur um einen kleinen Bruchteil des ganzen Volumens der Innenflüssigkeit handelt, so kann dieser Umstand bei der Berechnung der Temperaturkorrektion vernachlässigt werden.



2. Einzelheiten die Apparatur und die Methodik betreffend.

a) Das Osmometer. Die Fig. 31 und 32 geben die wichtigsten Teile des Osmometers in einem größeren Maßstab wieder.

Das Kollodiumhäutchen *A*, welches zirka 15 *cm*³ faßt, wird in ganz derselben Weise wie die später beschriebenen, größeren Häutchen des Dialysierapparates gemacht; nur sind die Dimensionen des bei der Darstellung benützten Reagierglases kleiner bemessen.

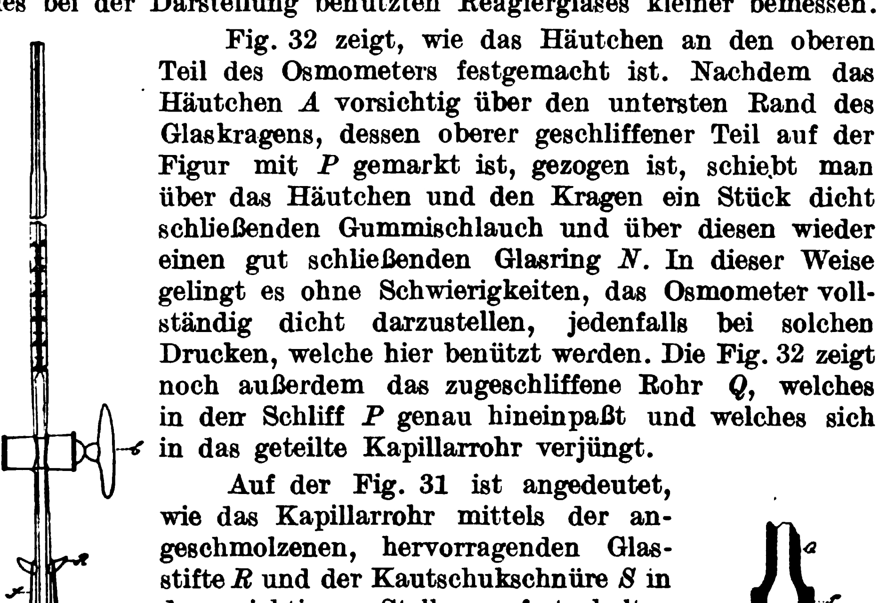


Fig. 31.

Fig. 32 zeigt, wie das Häutchen an den oberen Teil des Osmometers festgemacht ist. Nachdem das Häutchen *A* vorsichtig über den untersten Rand des Glaskragens, dessen oberer geschliffener Teil auf der Figur mit *P* gemarkt ist, gezogen ist, schiebt man über das Häutchen und den Kragen ein Stück dicht schließenden Gummischlauch und über diesen wieder einen gut schließenden Glasring *N*. In dieser Weise gelingt es ohne Schwierigkeiten, das Osmometer vollständig dicht darzustellen, jedenfalls bei solchen Drucken, welche hier benützt werden. Die Fig. 32 zeigt noch außerdem das zugeschliffene Rohr *Q*, welches in den Schliff *P* genau hineinpaßt und welches sich in das geteilte Kapillarrohr verjüngt.

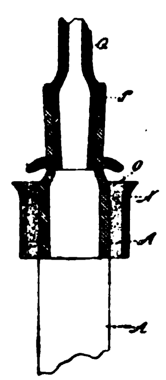


Fig. 32.

Auf der Fig. 31 ist angedeutet, wie das Kapillarrohr mittels der angeschmolzenen, hervorragenden Glasstifte *R* und der Kautschukschnüre *S* in der richtigen Stellung festgehalten wird. Auch ist der Nullstrich angegeben, welcher den Anfangspunkt der Teilung der Kapillare bezeichnet.

Wenn das Häutchen nicht gebraucht wird, hebt man es (mit aufgesetztem Glaskragen usw.) in Toluolwasser auf.

Ist ein Versuch auszuführen, spült man das Häutchen so gut wie möglich mit der betreffenden Außenflüssigkeit ab und beläßt es während etwa zehn Minuten in der reinen Außenflüssigkeit ganz eingesenkt. Danach gießt man die Außenflüssigkeit so gut wie möglich ab und bringt die Innenflüssigkeit mittels einer Pipette — vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden — in das Häutchen hinein und füllt es bis zum oberen Rand des Glaskragens. Sodann setzt man das Kapillarrohr vorsichtig — der Hahn *C* offen — und derart auf, daß die Innenflüssigkeit in das Rohr hinaufsteigt, ohne

irgendwo Luftblasen zu bilden[1]). Wenn das Kapillarrohr am Platz ist, gießt man mittels einer Kapillarpipette, deren lang ausgezogene Spitze durch das ganze Kapillarrohr bis unter den Hahn herunter reicht, mehr Innenflüssigkeit ins Kapillarrohr, bis sich der Meniskus ungefähr mitten an der Teilung des Rohres einstellt[2]). Schließlich legt man die Kautschukschnüre *S* an, stellt das Osmometer in die Außenflüssigkeit, ins *Dewar*-Gefäß hinein (siehe Fig. 30, S. 659), schließt sodann den Hahn *C* und mißt die Außenflüssigkeit derart ab, daß ihre Oberfläche genau bei der Nullmarke des Kapillars steht.

Jetzt kann das Kapillarrohr durch den Kautschukschlauch *G* (Fig. 30), mit dem Gegendruckapparat verbunden werden, wonach alles für die Messung bereit ist. Wie schon oben bemerkt (S. 660), ist es jedoch zweckmäßiger, das Ganze während einiger Stunden oder am liebsten über Nacht ruhig (mit geschlossenem Hahn *C*) stehen zu lassen, damit sich vollständiges Temperatur- und Diffusionsgleichgewicht einstellen kann und erst dann die Messung vorzunehmen.

Noch ist zu bemerken, daß die Außenflüssigkeit vor dem Versuch mit Toluol geschüttelt und sodann filtriert wird und daß man während der ganzen Dauer des Versuches einen mit Toluol gesättigten kohlensäurefreien Luftstrom durch die Außenflüssigkeit leitet. Dieser Luftstrom stockt nur während des Messens. Da Toluol durch das Kollodiumhäutchen diffundiert, genügt dieser toluolgesättigte Luftstrom, besonders wenn man vor dem Versuche die Innenflüssigkeit mit Toluol sättigt, um sowohl die Außen- als auch die Innenflüssigkeit gegen Fäulnis zu schützen, selbst wenn der Versuch sich über mehrere Tage erstreckt. Übrigens verrät sich eine eintretende, selbst ganz schwache Fäulnis sofort durch ein Steigen des osmotischen Druckes. Es ist nicht praktisch, so viel Toluol anzuwenden, daß sich eine Schicht an der Oberfläche der

[1]) Das Kapillarrohr muß selbstverständlich vor dem Versuch gereinigt und getrocknet sein; außerdem muß der Schliff mit Vaselin oder Hahnfett eingerieben, jeder Überschuß desselben aber sorgfältigst beseitigt sein, weil sich sonst leicht Luftblasen bilden.

[2]) Mit einiger Übung bietet diese Operation keine Schwierigkeit, wenn man nur darum besorgt ist, die Kapillarpipette auswendig gut abzuwischen, bevor man sie ins Kapillarrohr hineinsteckt, und weiter dafür sorgt, daß die Pipettenspitze ganz voll von Flüssigkeit ist und daß die Ausströmung erst anfängt, wenn die Spitze in die Flüssigkeit hineintaucht; dadurch wird die Bildung von Luftblasen vermieden. Sollten sich trotz allem irgendwo Luftblasen gebildet haben, dann müssen dieselben mittels eines Platindrahtes oder einer trockenen reinen Kapillarpipette weggeschafft werden, indem selbst kleine Luftblasen bei der Messung des osmotischen Druckes zu bedeutenden Fehlern Anlaß geben können. Die Gegenwart solcher lästigen Luftblasen wird indessen leicht dadurch entdeckt, daß es unter solchen Umständen unmöglich ist übereinstimmende Resultate zu bekommen, und zwar auch dann nicht, wenn die Messungen mit ganz kurzen Zeitintervallen vorgenommen werden.



Außenflüssigkeit findet oder bildet; denn teils wird dies eine genaue Probenahme von der Außenflüssigkeit beim Schluß des Versuches erschweren, teils greift flüssiges Toluol die Kautschukschnüre *S* stark an.

b) Der Thermostat besteht aus einem rektangulären Kupferkasten, der an zwei einander gegenüberstehenden Seiten mit einem durch die ganze Höhe gehenden Glasfenster versehen ist, welches das Durchsehen durch den Thermostaten ermöglicht. Derselbe ist von solchen Dimensionen ($33 \times 33 \times 42$ *cm*), daß er zwei Zylindergläser (mrk. *F* auf der Figur) auf einmal faßt, von welchem jedes ein *Dewar*-Gefäß mit Osmometer enthält. Die Temperatur des Thermostaten ist bei den hier erwähnten Versuchen zirka 18° gewesen und die Regulierung wird mittels eines langsamen Kaltwasserstromes und durch Erhitzen mit einer elektrischen Glühlampe bewerkstelligt, welche mittels eines üblichen elektrischen Thermoregulators angezündet und erlöscht wird. Selbstverständlich ist der Thermostat mit einem Rührer versehen. Die Temperaturschwankungen von Tag zu Tag sind gewöhnlich weit kleiner als 0·1° gewesen.

c) Die von der Kapillarwirkung herrührende Steigerung im Kapillarröhrchen bestimmt man mittels einer anderen Kapillare mit bekanntem Durchmesser, und für diese Bestimmung gebraucht man den Rückstand der Innenflüssigkeit, welcher beim Füllen des Osmometers übrig blieb, indem man von den kleinen Änderungen der Kapillarwirkung absieht, welche eventuelle Änderungen der Zusammensetzung der Innenflüssigkeit während des Versuches möglicherweise herbeiführen können.

Findet man jetzt bei der Messung der Kapillarwirkung in einem Kapillarrohr mit einem Durchmesser von b *mm* eine Steighöhe von a *cm* und hat das Kapillarrohr des Osmometers einen Durchmesser von b' *mm* und ist das spezifische Gewicht der Innenflüssigkeit d_e, so wird die von der Kapillarwirkung herrührende Korrektion, in *cm* Wasserdruck ausgedrückt, gleich: $a \,.\, d_e \,.\, b/b'$ sein.

3. Beschreibung einer einzelnen Messung.

Um das Verfahren noch mehr zu verdeutlichen, teilen wir hier alle Einzelheiten der Messungen und der Analysen einen einzelnen Versuch betreffend mit. Zur Untersuchung lagen eine Lösung von sechsmal unkristallisiertem Eieralbumin nebst einer etwa 7/n-Lösung reinen Ammoniumsulfates vor. Die Analyse dieser Lösung hatte gegeben, daß

100 *g* Eihydratlösung

2·0678 *g* Proteinstickstoff und
2·6585 „ Ammoniakstickstoff

und daß 100 *g* Ammoniumsulfatlösung

8·1371 *g* Ammoniakstickstoff

enthielten.

Bei der Umrechnung des Proteinstickstoffes zu Eihydrat gebrauchte man den Faktor 8·4 und nahm auf das an Eihydrat gebundene Ammoniumsulfat keine Rücksicht, indem dieses Verfahren bei der vorläufigen Berechnung hinlänglich genau ist, weil diese hauptsächlich dem Zweck dient, daß man der Außenflüssigkeit dieselbe oder doch annäherungsweise dieselbe Zusammensetzung wie dem Dispersionsmittel beizubringen imstande sein soll. Braucht man weiter für das Umrechnen des Ammoniakstickstoffes zu Ammoniumsulfat den üblichen Faktor 4·7163, bekommt man, daß

100 *g* Eihydratlösung

17·370 *g* Eihydrat,
12·538 „ $(NH_4)_2\,SO_4$ und
70·092 „ Wasser enthalten

und daß

100 *g* Ammoniumsulfatlösung

38·377 *g* $(NH_4)_2\,SO_4$ und
61·623 „ Wasser

enthalten.

Die beim Versuch benützte Innenflüssigkeit wurde in einem 25 *cm*³-Kolben gemischt und bestand aus zirka 20 *cm*³ Eihydratlösung (Gewicht 22·203 *g*), zirka 1 *cm*³ Ammoniumsulfatlösung (Gewicht 1·154 *g*) nebst Wasser zur Marke (Gewicht des Wassers: 4·065 *g*). Die Innenflüssigkeit hatte demnach die folgende Zusammensetzung:

	Eihydrat		$(NH_4)_2\,SO_4$		Wasser
22·203 *g* Eihydratlösung . . .	3·857 *g*	+	2·784 *g*	+	15·562 *g*
1·154 „ $(NH_4)_2\,SO_4$-Lösung .			0·443 „	+	0·711 „
4·065 „ Wasser					4·065 „
27·422 *g*	3·857 *g*	+	3·227 *g*	+	20·338 *g*

In der Innenflüssigkeit fanden sich also

auf 100 *g* Wasser 18·964 *g* Eihydrat und
15·867 „ $(NH_4)_2\,SO_4$

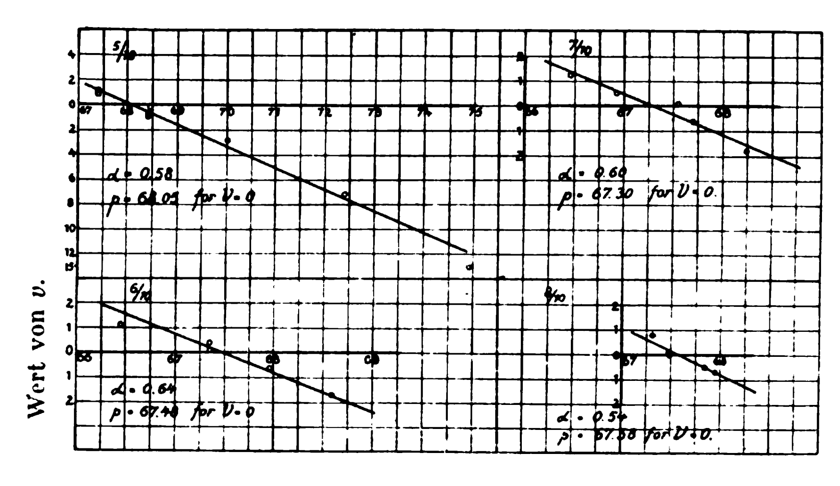
und die Außenflüssigkeit war jetzt derart zu bereiten, daß ihr Gehalt an Ammoniumsulfat in 100 *g* Wasser möglichst angenähert derselbe wie derjenige der Innenflüssigkeit wurde.

Die Außenflüssigkeit wurde dann folgenderweise dargestellt:

		$(NH_4)_2 SO_4$	Wasser	
179·70 *g*	$(NH_4)_2 SO_4$-Lösung	68·963 *g*	+ 110·737 *g*	enthalten
321·50 „	Wasser		321·500 „	
501·20 *g*		68·963 *g*	+ 432·237 *g*.	

Danach enthielt die Außenflüssigkeit auf 100 *g* Wasser 15·955 *g* $(NH_4)_2 SO_4$.

Nach der Zubereitung wurden sowohl die Innen- als auch die Außenflüssigkeit mit Toluol geschüttelt und nach einigem Stehenlassen im Eisschrank wurde in demselben der Überschuß von Toluol abfiltriert, wonach die filtrierten Lösungen im Eisschrank verweilten, bis sie unmittelbar bevor sie ins Osmometer gefüllt, auf 18° erwärmt wurden.



Wert von *p*. Fig. 33.

Der Apparat wurde am 3. Oktober 1914 gefüllt und zusammengestellt, wonächst der Hahn der Osmometerkapillare geschlossen wurde. Die Messungen wurden vom 5. bis 10. Oktober vorgenommen und die Resultate sind in der Tabelle 9 (S. 668) zusammengestellt.

Die auf der Fig. 33 und in der Tabelle 9 angeführten Messungsresultate und Berechnungen verstehen sich leicht, wenn man sich der obigen Beschreibung des Verfahrens erinnert. Es ist deshalb nur noch eine einzelne Bemerkung vonnöten. Während der Nacht zwischen dem 5. und dem 6. Oktober war die Flüssigkeit in der Osmometerkapillare um zirka 2 *cm* gestiegen, wahrscheinlich weil der Hahn nicht ganz dicht gewesen war. Vor der ersten Messung am 6. Oktober wurde deshalb mittels einer Kapillarpipette so viel der Flüssigkeit herausgenommen, daß der Stand ungefähr derselbe wie am vorhergehenden Tag war.

Tabelle 9.

Spezifisches Gewicht der Innenflüssigkeit (d_e): 1·093 (siehe S. 670), Der Apparat wurde am 3. Oktober 1914

Datum, Nummer der Messung	Dauer der Messung in Minuten	Die gemessene Änderung des Kapillarstandes während d. Zeit t	Die dem *Beckmann*-Thermometer abgelesene Mitteltemperatur	Die während der Mess. beobachtete Temperaturänd. in 0·001°	(Die Korrektion per 0·001° k_τ = 0·020)	Die gemessene u. korrig. Änderung d. Kapillarstand. während d. Zeit t	Änderung des Kapillarstandes während 10 Minuten
	t	h	$T_{Beckm.}$	τ	$k_\tau \times \tau$	$h \div k_\tau \times \tau = u$	$\frac{10u}{t} = v$
5./10. 1	9	÷ 11·7	2·566	+ 2	+ 0·04	÷ 11·7	÷ 13·0
2	19	÷ 13·4	2·568	+ 3	+ 0·06	÷ 13·5	÷ 7·1
3	12	÷ 3·4	2·568	+ 2	+ 0·04	÷ 3·4	÷ 2·8
4	21	÷ 0·5	2·570	0	0	÷ 0·5	÷ 0·2
5	25	÷ 2·0	2·570	0	0	÷ 2·0	÷ 0·8
6	21	÷ 1·9	2·567	÷ 5	÷ 0·10	÷ 1·8	÷ 0·9
7	10	+ 1·1	2·561	÷ 3	÷ 0·06	+ 1·2	+ 1·2
8	40	+ 3·3	2·555	÷ 11	÷ 0·22	+ 3·5	+ 0·9
6./10. 9	30	÷ 5·1	2·535	÷ 2	÷ 0·04	÷ 5·1	÷ 1·7
10	19	÷ 1·2	2·533	÷ 1	÷ 0·02	÷ 1·2	÷ 0·6
11	20	+ 0·8	2·532	÷ 2	÷ 0·04	+ 0·8	+ 0·4
12	16	+ 0·2	2·530	÷ 1	÷ 0·02	+ 0·2	+ 0·1
13	12	+ 1·3	2·529	÷ 1	÷ 0·02	+ 1·3	+ 1·1
7./10. 14	26	+ 3·1	2·490	+ 1	+ 0·02	+ 3·1	+ 1·2
15	39	+ 2·2	2·493	+ 4	+ 0·08	+ 2·1	+ 0·5
16	23	÷ 1·2	2·496	+ 3	+ 0·06	÷ 1·3	÷ 0·6
17	21	÷ 3·8	2·499	+ 2	+ 0·04	÷ 3·8	÷ 1·8
18	36	+ 0·3	2·501	+ 1	+ 0·02	+ 0·3	+ 0·1
8./10. 19	16	+ 1·3	2·501	0	0	+ 1·3	+ 0·8
20	11	÷ 0·8	2·502	+ 1	+ 0·02	÷ 0·8	÷ 0·7
21	19	÷ 1·0	2·502	0	0	÷ 1·0	÷ 0·5
22	26	+ 0·2	2·504	+ 2	+ 0·04	+ 0·2	+ 0·1
23	135	÷ 0·1	2·510	+ 11	+ 0·22	÷ 0·3	9

Tabelle 9.

Kapillarwirkung 0·78 *cm* (siehe S. 665), Temperatur (C °): $T_{Beckm.}$ + 15·71. um 4 Uhr 45 Min. zusammengesetzt.

Der dem Manometer abgelesene Wasserdruck in *cm*	Höhe der Flüssigkeitssäule in der Kapillare in *cm*	Druck d. Flüssigkeitssäule d. Kap. in *cm* Wasserdr. (d_e ist das spez. Gew. d. Lösung)	Der gesamte Gegendruck in *cm* Wasserdruck	Wert d. Größe α in *cm* Wasserdr. (graph. ermittelt siehe Fig. 33)	Wert in *cm* Wasserdruck von	Der osmotische Druck in *cm* Wasserdruck	Mittel ÷ Kapillarwirkung
p_m	h_e	$h_e \times d_e = p_e$	$p_m + p_e = p$	α	$\alpha \times v$	$p + \alpha \times v = P$	
59·50	14·12	15·43	74·93		÷ 7·54	(67·39)	
56·97	14·12	15·43	72·40		÷ 4·12	68·28	
54·59	14·12	15·43	70·02		÷ 1·62	68·40	68·13
53·02	14·11	15·42	68·44	0·58	÷ 0·12	68·32	0·78
53·00	14·11	15·42	68·42		÷ 0·46	67·96	67·35
53·00	14·11	15·42	68·42		÷ 0·52	67·90	
51·98	14·11	15·42	67·40		+ 0·70	68·10	
51·98	14·12	15·43	67·41		+ 0·52	67·93	
52·54	14·68[1])	16·05	68·59		÷ 1·09	67·50	
51·92	14·68	16·05	67·97		÷ 0·38	67·59	67·46
51·30	14·69	16·06	67·36	0·64	+ 0·26	67·62	0·78
51·30	14·69	16·06	67·36		+ 0·06	67·42	66·68
50·40	14·69	16·06	66·46		+ 0·70	67·16	
50·29	14·80	16·18	66·47		+ 0·72	67·19	
50·73	14·81	16·19	66·92		+ 0·30	67·22	67·26
51·52	14·81	16·19	67·71	0·60	÷ 0·36	67·35	0·78
52·09	14·79	16·17	68·26		÷ 1·08	67·18	66·48
51·14	14·79	16·17	67·31		+ 0·06	67·37	
51·15	14·80	16·18	67·33		+ 0·43	67·76	
51·77	14·80	16·18	67·95		÷ 0·38	67·57	67·59
51·67	14·80	16·18	67·85	0·54	÷ 0·27	67·58	0·78
51·31	14·80	16·18	67·49		+ 0·05	67·54	66·81
51·31	14·80	16·18	67·49		0	67·49	

[1]) Siehe S. 670.

Betreffs des Messungsresultates ersieht man, daß sich während der zwei Tage, welche zwischen der Füllung des Apparates und der ersten Messung verlaufen sind, ein so gut wie vollständiges Diffusionsgleichgewicht eingestellt hat, indem sich der osmotische Druck während der ganzen Meßzeit sehr angenähert konstant erhält. Das kleine, aber sicher nachweisbare Sinken des osmotischen Druckes, welches zwischen dem 5. und dem 6. Oktober auftritt, ist doch kaum dem oben erwähnten ganz unbedeutenden Volumenzuwachs zu verdanken, sondern rührt wahrscheinlich davon her, daß das Diffusionsgleichgewicht erst am 6. Oktober vollständig erreicht worden ist.

Nach beendeter Messung wurden Proben für die Analysen, wie oben erwähnt, entnommen:

Es wurde mittels der Pipette Nr. 1 [1]) 5 *cm*³ Innenflüssigkeit abgemessen, welche in einem 100 *cm*³-Meßkolben gewogen, danach mit Wasser bis an die Marke aufgefüllt und wieder gewogen wurden. Nach gutem Schütteln wurden 3 × 20 *cm*³ von der verdünnten Lösung für die Analyse abgewogen:

Gewicht der 5 *cm*³	Gewicht der 100 *cm*³	Gewicht der 20 *cm*³
5·4980 *g*	100·212 *g*	Kolben Nr. 36: 20·069 *g*
		„ „ 39: 20·065 „
		„ „ 44: 20·054 „
		Mittel: 20·063 *g*

Die beim Titrieren verwendete Thiosulfatlösung war 1·0035 n/14·01; der Minderverbrauch dieser Lösung war bei der Bestimmung des

	Ammoniakstickstoffes	Proteinstickstoffes
Kolben Nr. 36	27·69 *cm*³	17·94 *cm*³
„ „ 39	27·64 „	17·82 „
„ „ 44	27·63 „	17·94 „
Mittel	27·653 *cm*³	17·90 *cm*³

100 *g* Innenflüssigkeit enthielten demgemäß:

$$\frac{27 \cdot 653 \,.\, 1 \cdot 0035 \,.\, 100 \cdot 212 \,.\, 100}{20 \cdot 063 \,.\, 5 \cdot 4980 \,.\, 1000} = 2 \cdot 5210\ g$$

Ammoniakstickstoff (a_b) nebst, in derselben Weise berechnet, 1·6319 *g* Proteinstickstoff (p_b).

[1]) Da 5 mit dieser Pipette bei Zimmertemperatur abgemessene Kubikzentimeter Wasser 5·032 *g* wogen, konnte das spezifische Gewicht der Innenflüssigkeit (d_e, siehe Tabelle 9) mit einer Genauigkeit, die für diesen Zweck hinlänglich ist, zu 5·4980 : 5·032 = 1·093 gesetzt werden.



Aus der Außenflüssigkeit wurden 10 *cm*³, abgemessen in einem 100 *cm*³-Meßkolben, gewogen, danach mit Wasser bis an die Marke nachgefüllt und wieder gewogen. Nach gutem Schütteln wurden für die Analyse 3 × 8·5 *cm*³ [1]) der verdünnten Lösung abgewogen:

Gewicht der 10 *cm*³	Gewicht der 100 *cm*³	Gewicht der 8·5 *cm*³
10·785 *g*	100·563 *g*	Kolben Nr. 46: 8·555 *g*
		„ „ 54: 8·544 „
		„ „ 83: 8·609 „
		Mittel: 8·569 *g*

Es fand sich kien Proteinstickstoff, und beim Titrieren des Ammoniakstickstoffes war der Minderverbrauch an Thiosulfatlösung bei dem

Kolben Nr. 46:	26·65 *cm*³
„ „ 54:	26·63 „
„ „ 83:	26·86 „
Mittel:	26·713 *cm*³.

100 *g* Außenflüssigkeit enthielten demgemäß: 2·9169 *g* Ammoniakstickstoff (a_f).

Außerdem enthielten 100 *cm*³ der Außenflüssigkeit 0·08 *mg* „koagulablen" Stickstoff und weniger als 0·1 *mg* „nicht koagulablen" Stickstoff.

Durch elektrometrische Messung der Wasserstoffionenkonzentration wurde gefunden:

in der Innenflüssigkeit $h = 13{\cdot}58 \,.\, 10^{\div 6}$: $p_H = 4{\cdot}867$ und
„ „ Außenflüssigkeit $h = 17{\cdot}91 \,.\, 10^{\div 6}$: $p_H = 4{\cdot}747$.

Das Resultat des beschriebenen Versuches ist also folgendes: Eine ammoniumsulfathaltige Eieralbuminlösung von der Zusammensetzung und der Wasserstoffionenkonzentration der Innenflüssigkeit ist bei 18⁰, 21 (2·50 + 15·71) mit einer Ammoniumsulfatlösung von der Zusammensetzung und Wasserstoffionenkonzentration der Außenflüssigkeit in vollständigem Gleichgewicht, wenn die Eieralbuminlösung einem Druck unterworfen ist, welcher dem Druck einer 66·81 *cm* hohen Wassersäule von der Zimmertemperatur (20⁰) gleich ist. Dieser Druck bildet deshalb ein Maß des osmotischen Druckes der betreffenden Eieralbuminlösung unter den obwaltenden Umständen.

[1]) Die zu analysierende Menge wurde hier derart abgemessen, daß der Ammoniakgehalt der einzelnen Proben demjenigen der Proben der Innenflüssigkeit nach Möglichkeit gleich kam (siehe S. 624).



Aus den erhaltenen Werten von a_b, p_b, a_f und p_f (p_f ist hier gleich Null), läßt sich natürlich r mittels der Formel

$$r = \frac{100\,(a_f \div a_b)^{1)}}{a_f \,.\, p_b \div a_b \,.\, p_f}$$

berechnen.

Im gegenwärtigen Fall wird

$$r = \frac{100\,(2{\cdot}9169 \div 2{\cdot}5210)}{2{\cdot}9169 \,.\, 1{\cdot}6319} = 8{\cdot}32.$$

4. Berechnung der Abhängigkeit des osmotischen Druckes von der Eieralbuminkonzentration.

Die Gestalt, unter welcher wir das Ergebnis einer Messung des osmotischen Druckes oben zusammengefaßt haben, gibt einfach die bei der direkten Messung ermittelten Werte wieder. Bei der Bearbeitung eines größeren Versuchsmaterials ist es indessen des Vergleiches halber notwendig, die direkt erhaltenen Größen derart umzurechnen, daß die Resultate die Abhängigkeit des osmotischen Druckes von der Albuminkonzentration veranschaulichen.

Die einfachste und noch dazu die häufigst benützte Ausdrucksweise der Albuminkonzentration ist diejenige, daß die Konzentration c dem in der Volumeneinheit der Lösung gegenwärtigen Stickstoff proportional und weiter der osmotische Druck P dem c proportional gerechnet wird, derart, daß P gleich $R\,T\,c$ wird. Man setzt also voraus, daß das Gesetz *van 't Hoffs* für die hier in Rede stehenden Lösungen gilt. Das Gesetz *van 't Hoffs* gilt indessen nur für ganz schwache Lösungen, wo das Volumen des gelösten Stoffes mit dem des Lösungsmittels verglichen zu vernachlässigen ist. Bei einigermaßen starken Eieralbuminlösungen darf man aber nicht annehmen, daß dies der Fall ist und es ist deshalb bei den Berechnungen vorzuziehen, immer das Volumen des Eihydrates mit zu berücksichtigen.

Aus diesem Grund ist hier die Albuminkonzentration gewöhnlich nicht im Verhältnis zum Volumen der Lösung, sondern im Verhältnis zum Volumen oder Gewicht des Dispersionsmittels angegeben. Unter dem Ammoniumsulfatgehalt, S, des Dispersionsmittels verstehen wir diejenige Anzahl Gramme Ammoniumsulfat, welche 100 g Wasser des Dispersionsmittels enthalten und unter Eihydratkonzentration, E, die Anzahl Milligrammäquivalente Proteinstickstoff pro 100 g Wasser des Dispersionsmittels. In solchen Fällen, wie z. B. bei der Angabe der Größe des osmotischen Druckes,

[1]) Siehe S. 614.

wo es mit dem Eihydratgehalt, ε, der Volumeneinheit des Dispersionsmittels zu rechnen zweckdienlich ist, wird $\varepsilon = E/V_s$, wo V_s dasjenige Volumen des Dispersionsmittels in Kubikzentimetern bei 18° bedeutet, welches 100 g Wasser enthält[1]).

Setzen wir jetzt vorläufig voraus, daß die Größe des osmotischen Druckes mit der Konzentration, ε, so wie dieselbe oben definiert ist, proportional ist, und nehmen wir weiter an, daß jedes einzelne Albuminmolekül oder wie ein Molekül wirkende Albuminpartikel n Stickstoffatome enthält, so wird

$$P = \frac{R \,.\, T \,.\, \varepsilon}{n} = \pi \,.\, \varepsilon$$

also

$$\pi = \frac{P}{\varepsilon} = \frac{P \,.\, V_s}{E},$$

wo $\pi \left(= \frac{R \,.\, T}{n}\right)$ den osmotischen Druck pro Milligrammäquivalent Proteinstickstoff pro Kubikzentimeter Dispersionsmittel angibt. Da wir den Druck in Kubikzentimetern Wasserdruck messen und das Kubikzentimeter als Volumeneinheit benützen, so haben wir bei 18°:

$$R \,.\, T = \frac{p_0 \,.\, V_0}{T_0}\, T_{18} = \frac{22{\cdot}412 \times 76 \times 13{\cdot}596 \times 1 \times 291}{273} = 24685\ cm.$$

Wenn unsere oben genannte Voraussetzung richtig ist, daß der osmotische Druck mit der Konzentration ε proportional ist, dann wird π, welches ja gleich P/ε ist, konstant und vom Gehalt der Lösung an diffusiblen Stoffen unabhängig gefunden werden. Wie zu erwarten war, findet man indessen nicht ein konstantes π, sondern dagegen ein π, welches mit der Ammoniumsulfat- und der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung variiert.

Auf die Erklärung dieser Variationen tiefer einzugehen als es S. 609 geschehen ist, muß aber, wie schon dort bemerkt, als verfrüht betrachtet werden.

C. Darstellung und Reinigung des Eieralbumins.

a) Die Kristallisation des Eieralbumins und dessen Reinigung von Asche, Mukoid und Konalbumin.

Mit der Kristallisation beabsichtigt man die Beseitigung der in der von Globulin befreiten Eiweißlösung anwesenden Verunreinigungen, von welchen wir besonders auf die Aschenbestand-

[1]) Die Berechnung dieser Größen mittels der Analysenresultate betreffend wird teils auf S. 642 und teils auf die Tabelle 11 verweisen.

teile, die stickstoffhaltigen, nicht koagulierbaren Stoffe, welche wir unter dem Namen „M u k o i d“ zusammenfassen und auf die stickstoffhaltigen koagulierbaren, aber nicht kristallisierbaren Stoffe, die wir mit dem Sammelnamen „K o n a l b u m i n“ bezeichnen, Rücksicht nehmen.

Das Verfahren ist das folgende: Das Eiweiß von 60 frisch gelegten Eiern (zirka 2 *l*) wird mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung vermischt und gut geschlagen, wonach der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert wird. Zu dem klaren, rotgelben, nach Ammoniak riechenden Filtrat (zirka 3300 cm^3) fügt man gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zur bleibenden Trübung (zirka 140 cm^3), und dann bestimmt man, wieviel n/5-Schwefelsäure zuzufügen ist, um einer herausgenommenen, gemessenen Probe des Filtrates eine der Kristallisation günstige Wasserstoffionenkonzentration zu erteilen. Beim Zusatz der n/5-Schwefelsäure löst sich zuerst die oben erwähnte Unklarheit, dann geht die rotgelbe Farbe der Lösung in Gelb über und zuletzt scheidet sich ein amorpher, voluminöser Niederschlag aus, welcher sich anfangs leicht durch Rühren oder Schütteln löst, später aber immer schwieriger in Lösung zu bringen ist. Die dem Filtrat zuzufügende Säuremenge ist, um der Lösung eine der Kristallisation günstige Wasserstoffionenkonzentration beizubringen, so zu bemessen, daß der durch den Säurezusatz hervorgerufene Niederschlag sich durch Rühren eben wieder unter Bildung einer stark opaleszierenden Flüssigkeit löst; eine Portion wie die genannte verlangt 500 bis 600 cm^3 n/5-Schwefelsäure, gewöhnlich desto mehr je älter die Eier sind.

Nachdem die Säure zugesetzt und gut gerührt worden ist, fängt die Kristallisation gewöhnlich im Laufe einer Stunde an, und sie wird durch häufiges Rühren oder Schütteln gefördert wie auch durch die Zufügung von etwas Impfungsmaterial (Kristallen mit anhängender Mutterlauge) von einer früheren Kristallisation. Wenn die Kristallisation in gutem Gange ist, wird die Masse beiseite gestellt während zwei bis fünf Tagen bei gewöhnlicher Temperatur unter wiederholtem Rühren. Dann wird ohne Saugen durch gewöhnliche Filter filtriert und der Niederschlag des Waschens wegen auf mehrere Filter verteilt; für eine Portion wie die in Rede stehende werden fünf Filter von 24 *cm* angemessen sein. Sollte die Mutterlauge am nächsten Tage noch nicht vollständig abgelaufen sein, läßt dieselbe sich mittels einer Pipette abziehen oder auch vorsichtig abgießen, weil sich der Niederschlag ziemlich fest am Filter ablagert.

Zur Ermittlung der Zusammensetzung der Waschflüssigkeit stellt man, in einer Reihe Probiergläser, Mischungen dar, von welchen jede 10 cm^3 gesättigter Ammoniumsulfatlösung nebst

wechselnden Mengen von Wasser enthält; zu jeder dieser Mischungen fügt man jetzt ein paar Kubikzentimeter des Filtrates. Findet man dann, daß z. B. die Mischung „10 *cm*³ $(NH_4)_2$ SO_4-Lösung + 6·5 *cm*³ Wasser" wie auch sämtliche salzreichere Mischungen, durch diesen Zusatz von Filtrat unklar werden, während alle ammoniumsulfat-ärmeren Mischungen klar bleiben, so wird eine Mischung von 10 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit 7 Teilen Wasser als Waschflüssigkeit benützt. Mit dieser Mischung werden die Filter vollständig gefüllt, ohne daß der Niederschlag aufgerührt wird und die Waschflüssigkeit verdrängt dann nach und nach die zwischen den Kristallen zurückgebliebene Mutterlauge.

Am nächsten Tag wird der möglich noch nicht durchgelaufene Teil der Waschflüssigkeit vom Niederschlag abgegossen, wonach dieser so gut wie möglich von den Filtern abgeschabt und in eine geräumige Porzellanschale gebracht wird. Der an den Filtern hängende Rest wird in ausgekochtem Wasser gelöst, die erhaltene Lösung mit dem Niederschlag in der Schale vermischt und so viel ausgekochtes Wasser zugefügt, daß das Ganze durch gutes und wiederholtes Rühren vollständig in Lösung geht.

Die in dieser Weise erhaltene Lösung wird aufs neue dadurch zum Kristallisieren gebracht, daß man so lange gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugibt, als sich der augenblicklich entstehende Niederschlag durch gutes und anhaltendes Rühren eben wieder in Lösung bringen läßt. Bei häufig wiederholtem Umrühren und am leichtesten nach dem Zusatz etwas Impfungsmaterials fängt dann die Kristallisation bald wieder an, und das weitere Verfahren ist jetzt eine genaue Wiederholung des oben beschriebenen.

Das auskristallisierte Eieralbumin enthält schon nach drei Kristallisationen so gut wie nichts von Asche, Mukoid oder Konalbumin. Man hat aber immer sicherheitshalber sechsmal kristallisiert; die nach der dritten und fünften Kristallisation erhaltenen Lösungen wurden filtriert, um anwesendes Filtrierpapier und denaturiertes Albumin zu beseitigen.

Beim Ausfällen des Eierglobulins sowie bei der ersten Kristallisation kam gewöhnliches „reines" Ammoniumsulfat zur Verwendung und ebenso bei der ersten Filtrierung ordinäres Filtrierpapier. Bei allen späteren Operationen aber wurde nur das reinste Ammoniumsulfat, das zu verschaffen war (siehe S. 679) und besonders reines ausgewaschenes Filtrierpapier (Nr. 590) von der Firma *Schleicher & Schüll*, Düren, gebraucht, um nicht dem Eieralbumin Aschenbestandteile zuzuführen.

Die durch wiederholte Kristallisation vorwärtsschreitende Reinigung des Eieralbumins mag hier durch ein erläuterndes Beispiel näher beschrieben werden.

Als Ausgangsmaterial diente 1 *l* der in der oben beschriebenen Weise von Globulin befreiten Lösung von Hühnereiweiß, dessen Gehalt an Asche, an koagulablen und nicht koagulablen Stickstoffverbindungen im voraus bestimmt worden war. Das Eieralbumin dieser Lösung wurde dreimal auskristallisiert und sowohl in den dadurch erhaltenen Filtraten und Waschflüssigkeiten als auch in der durch Lösen des dreimal kristallisierten Niederschlages erhaltenen Endflüssigkeit ebenfalls der Gehalt an Asche und die Verteilung des Stickstoffes ermittelt. Sämtliche zum Kristallisieren und Filtrieren benützten Gefäße und Filter wurden gut gewaschen und auch die dadurch erhaltenen Lösungen (welche als „Reste" bezeichnet werden) wurden analysiert. Das Resultat dieser Analysen ist in der Tabelle 10 [1]) (siehe S. 677) zusammengestellt und auf diese Tabelle wird bei der folgenden näheren Besprechung jeder einzelnen der hier behandelten Verunreinigungen: Asche, Mukoid und Konalbumin verwiesen.

b) Asche.

Die Eindampfung der zur Aschenbestimmung vorliegenden Lösung und das Wegbrennen des organischen Stoffes und der Ammoniumsalze wurden in einer genau gewogenen, räumlichen Platinschale vorgenommen, welche in einen elektrisch geheizten *Heraeus*-Muffelofen angebracht wurde. Der Ofen ließ sich leicht einstellen, und zwar sowohl auf niedere Temperaturen unter 100° für die Eindampfung als auf höhere, welche die Veraschung und das Glühen verlangten. Um Verunreinigungen vom Ofenmaterial herrührend zu vermeiden, wurde das Innere des Ofens dermaßen mit Platinblech bekleidet, daß die Platinschale während des Prozesses nur mit Platin in Berührung kam. Im Schornstein des Ofens war eine Gasflamme angebracht, welche die übelriechenden Gasarten der Proteinverbrennung verbrannte. Sämtliche für die Aschenbestimmungen benützten Lösungen enthielten entweder reichliches Ammoniumsulfat oder sie wurden vor der Einengung mit etwas von diesem Salz in fester Form versetzt, weshalb die basischen Bestandteile der Asche wesentlich als Sulfate zur Wägung gebracht worden sind. Die Asche wurde nach der ersten Wägung mit starker Schwefelsäure befeuchtet und dann nach Eintrocknen und kurzem Glühen wieder gewogen.

[1]) Aus der untersten, mit „Summe" bezeichneten Reihe der Tabelle ersieht man, daß während die gesamte gefundene Menge von Asche sehr nahe an 100% der ganzen anwesenden Menge ist, so fehlt gegen 2% des Proteinstickstoffes. Diese Sachlage rührt gewiß davon her, daß es trotz einer so weit als möglich quantitativen Arbeitsweise nicht gelungen ist, allen Proteinstoff aus den benützten großen Filtern auszuwaschen, und der Proteinstickstoff in den als „Reste" bezeichneten Lösungen sich deshalb zu niedrig beziffert.



Tabelle 10.

Die Reinigung des Eieralbumins durch Krystallisation.

	Aschenmenge		Menge von Stickstoff in nichtkoagulierbaren Verbindungen („Mukoidstickstoff")		Menge von Stickstoff in koagulierbaren Proteinstoffen		Koagulierbare, aber nicht krystallisierbare Albumine („Konalbumin")						
							Die Mutterlauge			Eine Mutterlauge der vorliegenden Konz. v. H. u. Am_2SO_4 enthält v. kristallisierbaren Eihydrat per 100 g Wasser	Die Mutterlauge enthält von Konalbumin per 100 g Wassser	Die Mutterlauge enthält ausgedrückt in Proz. des ursprünglich. Gehaltes an koagulierbaren Proteinstoffen	
							hat	enthält per 100 g Wasser					
	in g	in Prozent der Gesamtasche	in mg	in Prozent des gesamten Mukoidstickstoffes	in mg	in Prozent des gesamten koagulierb. Proteinstickstoffes	p_H	Am_2SO_4 g	Eihydrat g	g	g	von kristallisierbarem Protein	von nichtkristallisierb. Protein
Die urspr. Lösg.	5·122	100·00	894·1	100·00	6608·7	100·00	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat I	4·545	88·73	803·8	89·90	1908·1	28·87	4·604	27·789	1·421	ca. 0·274	ca. 1·147	ca. 5·57	ca. 23·30
Waschflüssigk. I .	0·486	9·49	57·8	6·46	177·2	2·68	—	—	—	—	—	—	—
Rest I	0·039	0·76	4·4	0·49	53·0	0·80	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat II	0·022	0·43	13·4	1·50	311·0	4·71	4·652	28·479	0·292	„ 0·195	„ 0·097	„ 3·15	„ 1·56
Waschflüssigk. II	0·008	0·16	—	—	10·7	0·16	—	—	—	—	—	—	—
Rest II	—	—	—	—	44·8	0·68	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat III	0·008	0·16	0·0	0·00	193·5	2·93	4·699	28·365	0·234	„ 0·223	„ 0·011	„ 2·79	„ 0·14
Waschflüssigk. III	0·006	0·12	—	—	2·3	0·03	—	—	—	—	—	—	—
Rest III	—	—	—	—	37·5	0·57	—	—	—	—	—	—	—
Endlösung . . .	0·006	0·12	0·0	0·00	3741·0	56·61	—	—	—	—	—	—	—
Summe . .	5·120	99·97	879·4	98·35	6479·1	98·04	—	—	—	—	—	—	—

Aus der Tabelle 10, Stab 2 und 3, ersieht man, daß bei weitem der größte Teil der Asche durch die erste Kristallisation und Waschung beseitigt worden ist; doch finden sich auch noch im Filtrat II deutliche Aschenmengen, während die im Filtrat III und in der Endlösung vorgefundenen, minimalen Mengen im wesentlichen, wie wir gleich sehen werden, vom Phosphorgehalt des Albumins herrühren. Die qualitative Untersuchung der Aschenproben hat nämlich das folgende Resultat gegeben:

Die Aschenproben von „der ursprünglichen Lösung", dem „Filtrat I", der „Waschflüssigkeit I" und dem „Rest I" verhielten sich ganz gleich. Sie lösten sich beinahe vollständig in Wasser zu einer nicht völlig klaren Lösung, welche nach Filtrierung neutral gegen Lackmus reagierte und reichliches Sulfat, aber kein Chlorid, kleine, aber deutliche Mengen Kalziumsalze, aber nur eine Spur von Phosphaten enthielt. Auch der in Wasser unlösliche Teil enthielt nur eine Spur von Phosphaten. Die Phosphorsäure des genuinen Eiweiß ist wohl zusammen mit dem Globulin als Kalziumphosphat oder Magnesiumammoniumphosphat aus der ammoniakalischen Flüssigkeit hinausgefallen.

Der wässerige Auszug der Asche des „Filtrates II" gab eine deutliche Reaktion auf Sulfat, aber nur eine ganz schwache auf Phosphat. Indessen wurde bei nachfolgender Behandlung der Platinschale, welche an einzelnen Stellen mit kleinen, grauen Flecken besetzt war, mit ganz schwacher Salpetersäure eine Lösung erhalten, welche schwach auf Kalziumsalze, aber deutlich auf Phosphorsäure reagierte.

Der wässerige Auszug der Asche des „Filtrates III" gab eine schwache, aber sichere Reaktion auf Sulfat, auf Phosphat aber nur eine zweifelhafte. Ein mit schwacher Salpetersäure dargestellter Auszug enthielt nur schwache Spuren von Kalziumsalz, Phosphorsäure dagegen in leicht nachweisbaren Mengen.

Der wässerige Auszug von der Asche der Endlösung endlich gab nur eine äußerst schwache Reaktion auf Sulfat, keine Reaktion auf Kalzium, dagegen aber eine schwache auf Phosphorsäure. An der Platinschale fanden sich zahlreiche graue Flecken, welche durch Behandlung mit warmer, ganz schwacher Salpetersäure fast völlig verschwanden; die salpetersaure Lösung enthielt kein Kalziumsalz, aber deutlich wahrnehmbare Mengen von Phosphorsäure. Es kann deshalb kaum in Zweifel gezogen werden, daß die grauen Flecken Phosphor, wahrscheinlich mit Platin verbunden, enthalten. Damit steht es auch in guter Übereinstimmung, daß die Platinschale durch jede Aschenbestimmung mit nachfolgender Reinigung ein paar Milligramm des Gewichtes einbüßte. Dieser Phosphor rührt gewiß nicht von etwaigen Verunreinigungen her, sondern stammt aus dem Albumin selbst, indem dieses nach den Analysen *Thomas*

B. Osbornes und *G. F. Campbells*[1]) 0·12% Phosphor enthält. Nimmt man hierauf Rücksicht und bedenkt man noch dazu, daß diejenige „Asche", welche aus der Endlösung gewonnen war, nur eine äußerst geringe Spur von Sulfat und kein Kalziumsalz enthielt, dann darf man wohl ohne Bedenken sagen, daß die Lösung des Eieralbumins schon nach drei Kristallisationen desselben praktisch genommen aschenfrei ist.

Die größte Schwierigkeit bei der Darstellung von aschenfreien Eieralbuminlösungen liegt in der Beschaffung von hinlänglich reinem Ammoniumsulfat. Auch das reinste Produkt des Handels, von der Firma *C. A. F. Kahlbaum*, Berlin, „Zur Analyse mit Garantieschein", ist nicht immer für diesen Gebrauch rein genug. In 100 *g* von solchen Ammoniumsulfatpräparaten wurden oft 2 bis 5 *mg*, ja einmal sogar 9 *mg* Asche gefunden, welche bisweilen Kalziumsulfat und oft reichliches Phosphat enthielt. Die Firma *C. A. F. Kahlbaum* hat es indessen bereitwilligst unternommen, ein mit besonderer Sorgfalt gereinigtes Ammoniumsulfat darzustellen, welches in 100 *g* weniger als 1 *mg* Asche enthält. Erst die Anwendung solches sehr reinen Ammoniumsulfates ermöglicht die Darstellung von aschefreiem Eieralbumin.

(Mit Rücksicht auf den möglichen Inhalt des Ammoniumsulfates an „Überschuß" von Schwefelsäure oder Ammoniak siehe oben, S. 640.)

c) Mukoid.

Wie schon erwähnt, benützen wir den Namen Mukoid als gemeinschaftliche Benennung sämtlicher im Eiweiß anwesenden, stickstoffhaltigen Stoffe, welche durch Erwärmen nicht koagulieren und die Bestimmung des Mukoidstickstoffes geschieht dementsprechend dadurch, daß man aus dem Filtrat von den koagulierten Proteinstoffen das Ammoniak wegschafft und dann im Rest den Totalstickstoff nach *Kjeldahl*, wie oben (siehe S. 626) beschrieben, bestimmt. Hier soll nur ein einzelner Punkt hervorgehoben werden, welcher bei der Analyse einigermaßen reiner Eieralbuminlösungen keine Rolle spielt, der aber von Belang ist, sobald man Lösungen zu analysieren hat, in welchen die meisten der Bestandteile des genuinen Eiweiß noch vorhanden sind.

In einer früheren Abhandlung[2]) ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß diejenige Menge von Stickstoff, welche beim Erwärmen einer globulinfreien, übrigens aber genuinen Eiweiß-

[1]) Journ. Amer. Chem. Soc. **22**. 440 (1900).

[2]) *S. P. L. Sörensen* und *E. Jürgensen*: Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. **10**. 1 (1910); Biochem. Zeitschr. **31**. 397 (1911).

lösung in der Lösung bleibt, von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängt, und zwar außer von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Salzgehalt, welche beide immer bei der Koagulation der Eiweißstoffe von größerem oder kleinerem Belang sind, auch noch von der Dauer des Erhitzens und von der Menge des auskoagulierten Niederschlages. Beabsichtigt man jetzt — wie bei den hier beschriebenen Reinigungsversuchen — einen Vergleich der Mengen nichtkoagulierbarer Eiweißstoffe, welche sich einerseits in der als Ausgangsmaterial dienenden Lösung vorfinden und die andererseits in der beim Kristallisieren erhaltenen eiweißärmeren, aber ammoniumsulfatreicheren Mutterlauge enthalten ist, dann ist es notwendig, die Probe des Ausgangsmaterials vor dem Erhitzen derart mit einer angemessenen Ammoniumsulfatlösung zu verdünnen, daß sich die Koagulation der beiden Proben soweit als möglich unter gleichen Umständen vollzieht. Dieser Bedingung hat man selbstverständlich Rechnung getragen in den Versuchen, deren Resultate sich in der Tabelle 10, S. 677 wiedergegeben finden.

Die im vierten und fünften Stab der Tabelle mitgeteilten Zahlen zeigen, daß die Entfernung des Mukoides im großen und ganzen eben so glatt verläuft wie die Beseitigung der Asche. Weitaus der größte Teil des Mukoides wird durch die erste Kristallisation entfernt und nach drei Kristallisationen ist die Menge so geringfügig, daß es sich in dieser Weise nicht nachweisen läßt.

d) Konalbumin.

Während somit der Aschengehalt und der Gehalt an nicht koagulierbaren Stickstoffverbindungen sich einigermaßen leicht genau ermitteln lassen, gilt dasselbe nicht für den Gehalt an koagulierbarem, aber nicht kristallisierbarem Eieralbumin, die, wie schon erwähnt, unter dem Sammelnamen Konalbumin zusammengefaßt werden. Das gesamte kristallisierbare Albumin fällt nämlich bei der Kristallisation niemals völlig aus und die Mutterlauge wird deshalb immer neben dem nicht kristallisierbaren auch noch kristallisierbares Eieralbumin enthalten. Die Menge des letzteren ist, wie oben entwickelt, von einer ganzen Reihe von Umständen abhängig, und zwar besonders von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ammoniumsulfatgehalt der Lösung, von der Temperatur und der Dauer der Kristallisation, aber wahrscheinlich auch von den Verunreinigungen der Mutterlauge und von der Häufigkeit des Rührens oder Schüttelns während der Kristallisation. Dessenungeachtet könnte man sich einigermaßen zuverlässige Schätzungen darüber bilden, inwieweit die Reinigung des Eieralbumins durch wiederholte Kristallisationen auch mit Bezug auf das Konalbumin eine effektive ist, indem man das folgende Verfahren angewandt hat.

Die zu untersuchende Mutterlauge wurde analysiert und ihr Gehalt an Ammoniumsulfat und an Eihydrat pro 100 *g* Wasser berechnet, indem für die ganze vorhandene Menge Proteinstickstoff der Faktor $x = 7{\cdot}86$ gesetzt wurde. Dann wurde mittels der S. 605 ff. mitgeteilten Kurven eingeschätzt, wieviel kristallisierbares Eihydrat pro 100 *g* Wasser unter den obwaltenden Verhältnissen (Konzentration des Ammoniumsulfates und der Wasserstoffionen, Temperatur und Kristallisationsdauer) in der Mutterlauge vorhanden sein sollte, indem man voraussetzte — was wahrscheinlich nicht ganz richtig ist —. daß kein anderer Umstand als die hier genannten, z. B. auch nicht ein eventueller Inhalt an Konalbumin, die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Kristallisation beeinflußte. Mittels eines Vergleiches des in dieser Weise „berechneten" Gehaltes an kristallisierbarem Eihydrat und des gefundenen Gehaltes an Eihydrat überhaupt konnte dann die vorhandene Menge nicht kristallisierbaren Eihydrates eingeschätzt werden. Als erläuterndes Beispiel mögen die Einzelheiten der Untersuchung des Filtrates I der in der Tabelle 10 (S. 679) wiedergegebenen Versuchsreihe mitgeteilt werden. Die Analyse dieses Filtrates ergab, daß 100 *g* desselben enthielten:

0·331	*g* Asche		0·331	*g* Asche,
4·524	„ Ammoniak-N . .	äquiv. mit	21.337	„ $(NH_4)_2SO_4$,
0·1388	„ „koag. Ei-N" . .	„ „	1·091	„ koag. Eihydrat,
0·0584	„ „nichtkoag. Ei-N"	„ „	0·459	„ Mukoid
nebst	. . . .		76·782	„ Wasser
			100·000	*g*.

Auf 100 *g* Wasser kommen somit { 27·789 *g* $(NH_4)_2SO_4$
1·421 „ koag. Eihydrat.

Die Dauer der Kristallisation war vier Tage bei Zimmertemperatur (18°) und die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrates I entsprach dem $p_H = 4{\cdot}604$.

Aus der S. 605 (Fig. 16) gegebenen graphischen Darstellung der Versuche über den von der Ammoniumsulfatkonzentration geübten Einfluß auf das Gleichgewicht des auskristallisierten Albumins einerseits und der umgebenden Mutterlauge andererseits ist nun zu ersehen, daß, wenn eine Mutterlauge eine dem $p_H = 4{\cdot}85$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration besitzt und auf 100 *g* Wasser 27·789 *g* Ammoniumsulfat enthält, wird sie nach Kristallisation in vier Tagen bei 18° 0·422 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser enthalten.

Nun entspricht aber die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrates I nicht dem $p_H = 4{\cdot}85$, sondern dem $p_H = 4{\cdot}604$, und

bei dieser letzteren Konzentration ist die Kristallisation — alles übrige gleich — vollständiger als bei der ersteren. Aus der Fig. 18 ersieht man durch Benützung der einer fünftägigen Kristallisationsdauer bei 18° entsprechenden mittleren Kurve des oberen Kurvenbündels, daß eine Mutterlauge mit 25·947 *g* Ammoniumsulfat in 100 *g* Wasser 0·640 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser bei $p_H = 4·85$ enthält und 0·412 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser bei $p_H = 4·604$.

Die letztgenannte Mutterlauge wird demnach nur 0·644mal soviel Eihydrat wie die erstere enthalten.

Weiter ersieht man durch Benützung der auch einer fünftägigen Kristallisationsdauer bei 18° entsprechenden mittleren Kurve des untersten Kurvenbündels, daß eine Mutterlauge mit 27·121 *g* $(NH_4)_2 SO_4$ pro 100 *g* Wasser 0·326 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser bei $p_H = 4·85$ enthält und 0·212 *g* Eihydrat in 100 *g* Wasser bei $p_H = 4·604$.

Auch bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration wird somit die Eihydratmenge bei $p_H = 4·604$ ein ähnlicher Bruchteil wie oben, und zwar 0·650, von derjenigen bei $p_H = 4·85$ sein.

Es wird somit die Annahme, daß das Verhältnis bei der Ammoniumsulfatkonzentration 27·789 *g* $(NH_4)_2 SO_4$ pro 100 *g* Wasser ein ganz entsprechendes ist, keinen wesentlichen Fehler bedingen, und da nun der Eihydratgehalt einer Mutterlauge mit dieser Salzkonzentration und mit $p_H = 4·85$, wie oben (S. 681) genannt, 0·422 *g* in 100 *g* Wasser sein wird, so wird die dem $p_H = 4·604$ entsprechende Menge etwa 0·422 . 0·65 = zirka 0·274 *g* in 100 *g* Wasser sein.

Das Resultat dieser Schätzung ist also, daß eine Mutterlauge, welche wie das Filtrat I durch eine viertägige Kristallisation gewonnen ist, 27·789 *g* Ammoniumsulfat in 100 *g* Wasser enthält und eine dem $p_H = 4·604$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration hat, zirka 0·274 *g* kristallisierbares Eihydrat in 100 *g* Wasser enthält. Da nun die gesamte gefundene Menge Eihydrates = 1·421 *g* in 100 *g* Wasser ist, so wird die in 100 *g* Wasser enthaltene Menge n i c h t k r i s t a l l i s i e r b a r e s Eihydrat 1·421 ÷ zirka 0·274 = zirka 1·147 *g* sein.

Mittels einer völlig analogen Betrachtung hat man gefunden, daß die Filtrate II und III bezw. zirka 0·195 und zirka 0·223 *g* kristallisierbares Eihydrat in 100 *g* Wasser enthalten müssen, und das heißt, wie die Zahlen der Tabelle 10, Stab 12 und 14, zeigen, daß in dem Filtrat II noch ein geringer, aber sicher nachweisbarer Gehalt an Konalbumin vorhanden ist, während das mit Bezug auf Filtrat III nicht mehr der Fall ist.

Also verhält sich das Konalbumin wie die Asche und das Mukoid der genuinen Eieralbuminlösung: Die Hauptmenge verschwindet schon bei der ersten Umkristallisation mit angehöriger

Waschung, und nach drei Kristallisationen bleibt es wahrscheinlich nur in Spuren zurück.

Hieraus darf man wohl schließen, daß das Eieralbumin sich ohne Schwierigkeiten von Asche, Mukoid und Konalbumin befreien läßt. Ein genaueres Durchgehen des Zahlenmaterials gibt zwar eine Andeutung davon, daß die Aschenbestandteile etwas leichter als das Mukoid und dieses wieder leichter als das Konalbumin wegzuschaffen ist; es muß aber doch angenommen werden, daß keine dieser drei Verunreinigungen nach drei Kristallisationen mit den gehörigen Waschungen in nennenswerten Mengen vorhanden sind. Da nichtsdestoweniger das gesamte Ausgangsmaterial der hier beschriebenen Versuche aus Eieralbumin dargestellt worden war, welches wenigstens sechsmal kristallisiert ist, so darf dasselbe als von den hier erwähnten Verunreinigungen frei angesehen werden.

e) Die Reinigung des Eieralbumins von Ammoniumsulfat durch Dialyse.

Nach ausgeführter Reinigung des Eieralbumins durch Kristallisation ist die nächste Aufgabe die, das anwesende Ammoniumsulfat so vollständig als möglich wegzuschaffen, was durch Dialyse geschehen muß. Es ist aber unmöglich, durch einfache Dialyse reinem Wasser gegenüber jede Spur der Bestandteile des Ammoniumsulfates, besonders des Ammoniaks, zu beseitigen. Dies ist nicht auffallend, wenn man sich erinnert, daß das Albumin ein amphoterer Körper ist, welcher sowohl saure wie basische Stoffe zu binden vermag, und zwar besonders die letzteren, weil beim Eieralbumin der saure Charakter der vorherschendere ist. Es hat sich unter diesen Umständen als zweckdienlich erwiesen, die Dialyse in der Weise zu leiten, daß alle Schwefelsäure entfernt wird, was leicht zu erreichen ist, wenn man zu angemessenen Zeitpunkten und in angemessenen Zwischenräumen der Albuminlösung ein wenig Ammoniak zugibt, wodurch noch an das Albumin gebundene Schwefelsäure in Ammoniumsulfat umgewandelt und wegdialysiert wird. Nach vollkommener Beseitigung der Schwefelsäure ist man natürlich außerstande, das Eieralbumin ganz von Ammoniak durch Dialyse zu befreien. Das als eine Säure wirkende Eieralbumin vereinigt sich nämlich mit dem Ammoniak zu einem Ammoniumsalz und nur der Überschuß an Ammoniak dialysiert leicht weg. Da es nun möglich ist, kleine Ammoniakmengen mit ziemlich großer Genauigkeit zu bestimmen, so ist bei der Dialyse schließlich folgenderweise zu verfahren:

Erst wird während etwa einer Woche gegen ausgekochtes destilliertes Wasser dialysiert, wodurch weitaus der größte Teil des Ammoniumsulfates entfernt wird. Danach wird der Eieralbuminlösung so vieles n/1-Ammoniak zugesetzt, daß sie eine schwache, aber deutliche alkalische Reaktion Lackmuspapier gegenüber bekommt, und nun weiter etwa eine Woche gegen ausgekochtes Wasser dialysiert. Um eine Verdünnung der Eieralbuminlösung während der Dialyse zu vermeiden, wird dieselbe in einem Apparat vorgenommen, welcher es erlaubt, die „Außenflüssigkeit" (das Wasser) unter einen solchen Minderdruck zu stellen, daß der osmotische Druck der „Innenflüssigkeit" (der Albuminlösung) dadurch ausgeglichen wird. Die Behandlung mit n/1-Ammoniak wird zum zweiten und, wenn nötig, zum drittenmal wiederholt, indem die Schwefelsäure erst dann als vollständig beseitigt betrachtet wird, wenn durch die unten beschriebene Probe (siehe S. 690) weder im letzten Dialysat vor dem Zusatz des Ammoniaks noch im ersten Dialysat nach demselben Schwefelsäure nachzuweisen ist (vgl. S. 692). Nach dem letzten Ammoniakzusatz wird noch eine Woche gegen ausgekochtes Wasser dialysiert und dann wird die Eieralbuminlösung filtriert und analysiert. Durch diese Analyse wird der Gehalt an Proteinstickstoff und an Ammoniakstickstoff ermittelt. Wird nun eine mit dem gefundenen Ammoniak äquivalente Menge Schwefelsäure (oder einer anderen Säure) zugesetzt, dann hat man eine wohldefinierte Eieralbuminlösung, deren Konzentration an Proteinstickstoff bekannt ist, und die außer dem Eieralbumin nur eine geringfügige und bekannte Menge Ammoniumsulfates (oder eines anderen Ammoniumsalzes), aber weder Ammoniak noch Schwefelsäure im Überschuß enthält. Aus einer solchen Lösung können natürlich durch Zusatz passender Mengen von Säuren, Salzen oder Ammoniak Eieralbuminlösungen der verschiedenartigsten, aber doch völlig bekannten Gesamtzusammensetzung hergestellt werden.

1. Der Dialyseapparat.

Die in Fig. 34 abgebildete Dialysierzelle ist der wesentliche Teil des Dialysierapparates. Die Zelle besteht aus einer mit zwei Tuben (*A* und *B*) versehenen Flasche, in deren zugeschliffenen Hals (*C*) ein hohler, oben trichterförmiger Stöpsel (*D*) genau einpaßt. Der Stöpsel trägt oben als Deckel eine kleine Glasglocke und an seinem unteren schwach konischen Teil ein wie ein Reagierglas geformtes Kollodiumhäutchen (*E*), dessen Darstellung unten beschrieben wird. Wenn der Schliff gut ist und das Häutchen am Stöpsel paßt, dann kann man mittels eines schwachen Druckes

gegen den Stöpsel — und wenn nötig durch Dichtung mit etwas reinem Vaselin — einen vollständig luftdichten Verschluß aufbringen.

Beim Gebrauch der Zelle wird die zu dialysierende, mit einem reichlichen Überschuß an Toluol gut vermischte Eieralbuminlösung durch den Trichter ins Häutchen gegossen, während ausgekochtes destilliertes Wasser durch *B* zugeleitet wird, wonach die Zelle in den gesamten Dialysierapparat eingeschaltet wird.

Dieser letztere, von welchem Fig. 35 eine schematische Darstellung gibt, besteht aus sechs Zellen, die nebeneinander in einem mit zerquetschtem Eise gefüllten Zinkkasten angebracht sind, der seinerseits im Eisschrank steht. Der Tubus *B* jeder der sechs Zellen ist mittels eines mit einem Quetschhahn versehenen Kautschukschlauches mit dem Glasrohr *F* verbunden, welches an den Behalter *G* führt; dieser Behalter ist im Eisschrank angebracht und dient zur Aufbewahrung und Kühlung des zur Erneuerung der Außenflüssigkeit bestimmten ausgekochten Wassers. *G* kann mittels Rohrleitungen, die durch die Decke des Eisschrankes führen, aus einem oben auf demselben gestellten Behalter gefüllt werden. Vom Tubus *A* führt ein mit Quetschhahn versehener Kautschukschlauch in die Flasche *H*, welche zum Aufsammeln der benützten Außenflüssigkeit dient. Jede Zelle hat ihre eigene Sammelflasche, und diese sechs Flaschen sind durch Kautschukschläuche, die mit Quetschhähnen versehen sind, mit dem gemeinsamen Rohr *J* verbunden, welches seinerseits durch ein T-Rohr außerhalb des Eisschrankes teils zum Druckregulator *K* führt und teils zu einer in der Figur nicht gezeichneten Wasserstrahlpumpe mit angehörigem Manometer.

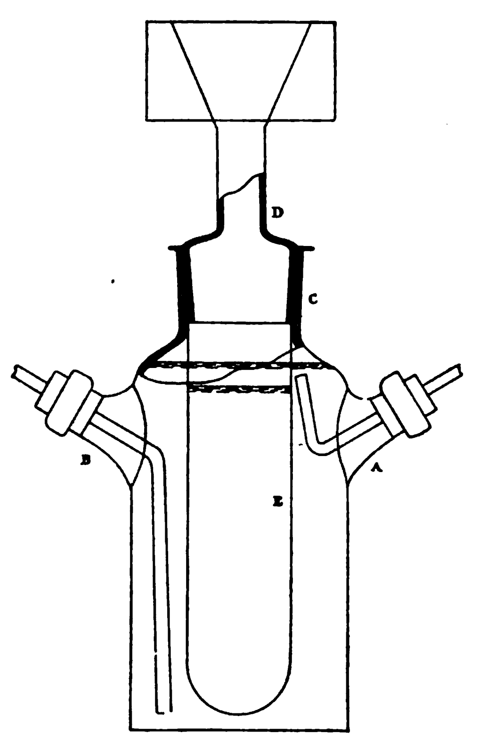


Fig. 34.

Beim Anfang der Dialyse, nachdem die Zellen, wie oben beschrieben, gefüllt und an den Platz gebracht sind, wird die Saugpumpe in Gang gesetzt, indem nur die Quetschhähne zwischen der Leitung *J* und den Flaschen *H* offen sind. Wenn der Druck nach

einiger Zeit so weit gefallen ist, daß der Regulator, welcher gewöhnlich auf einen Unterdruck von 24 bis 25 *cm* Quecksilber eingestellt ist, in Funktion tritt, dann öffnet man vorsichtig die Quetschhähne zwischen den Flaschen *H* und den Zellen, damit die Außenflüssigkeit auch unter den Minderdruck kommt, wodurch der osmotische Druck der Innenflüssigkeit kompensiert wird. Der Apparat kann jetzt sich selbst überlassen werden; nur muß die Außenflüssigkeit zu angemessenen Zeitpunkten gewechselt werden, was man einfach dadurch bewerkstelligt, daß man den Quetschhahn zwischen

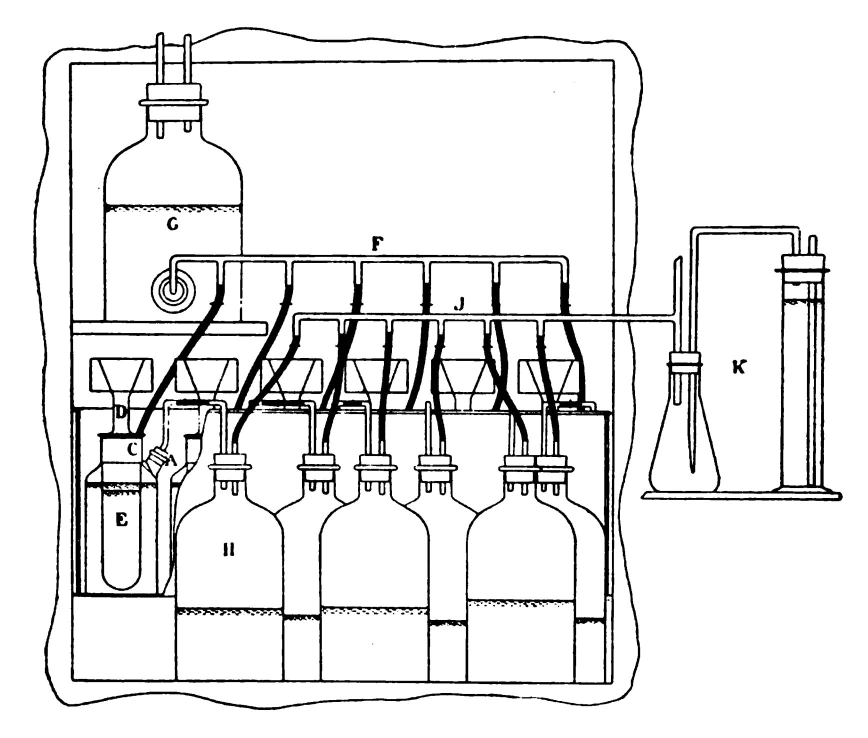


Fig. 35.

der Leitung *F* und der betreffenden Zelle vorsichtig öffnet. Des vorhandenen Unterdruckes wegen wird dann die Außenflüssigkeit aus der Zelle in *H* hinüber gesaugt und durch frisches Wasser aus dem Behälter *G* ersetzt. *G* ist mit einer Einteilung versehen, wodurch man die Menge des zugelaufenen Wassers beobachten kann. Wenn die Flaschen *H* entleert werden sollen, werden diejenigen Quetschhähne, welche sie von den Zellen scheiden, geschlossen, wodurch der Unterdruck in den Zellen erhalten wird, und die Quetschhähne werden erst dann wieder geöffnet, wenn in den entleerten Flaschen *H* der Unterdruck wiederhergestellt ist.

In betreff der Größenverhältnisse wurden die folgenden Dimensionen benützt: Jedes Kollodiumhäutchen hält 200 *cm*³, jede Zelle 600 bis 700 *cm*³ Außenflüssigkeit, *H* faßt 4 *l* und *G* 7 *l*. Die Außenflüssigkeit wird in 24 Stunden dreimal gewechselt, und bei jedem Wechsel läuft 1 *l* Wasser durch jede Zelle.

2. Darstellung der Kollodiumhäutchen.

Für die Darstellung sind nur bestimmte für diesen Zweck dargestellte Kollodiumsorten zu gebrauchen. Früher ist das von *C. A. F. Kahlbaum* bezogene „Kollodium zur Herstellung von Membranen für Dialyse" brauchbar gewesen, später aber war auch diese Ware nicht zufriedenstellend. Ein nach dem Verfahren von *W. Biltz* und *A. Vegesack*[1]) dargestelltes Kollodium hat aber nichts zu wünschen übriggelassen.

Als Unterlage bei der Darstellung der Häutchen dient ein auswendig mittels Seife gewaschenes und nachher gut abgetrocknetes dickwandiges Reagenzglas, welches im Boden ein kleines Loch (etwa 2 *mm* im Diameter) hat[2]). Dieses Reagenzglas wird an einen Korkpfropfen angebracht (aber nicht luftdicht), welcher wieder an einer wagrechten Achse sitzt, die durch einen Motor in langsame Rotation (40 bis 60 Umdrehungen pro Minute) versetzt werden kann. Die Lage dieser Achse ist derart in einem Gestell festgespannt, daß die Achse aus der wagerechten Stellung hinausgedreht werden kann.

Der erste Schritt der Darstellung besteht darin, daß man Kollodium auf das untere Ende des schwach geneigten (20 bis 30°) rotierenden Reagenzglases gießt, um dadurch einerseits das Loch im Boden zu verschließen und andererseits den untersten Teil des Häutchens zu verstärken. Einige Sekunden nach dem Aufgießen wird die Rotation einen Augenblick eingestellt, damit der Überschuß an Kollodium abtropfen kann. Nach sechs bis acht Minuten Rotation wird das erste eigentliche Aufgießen vorgenommen, während dessen die Achse mit dem Reagierglas rotiert und in schwach geneigter Stellung steht. Man gießt das Kollodium in einem dünnen Strahl vom oberen bis zum unteren Teil des Glases auf und unterbricht dann das Umdrehen einige Sekunden, um dem Überschuß des Kollodiums die zum Abtropfen nötige Zeit zu lassen. Dann wird die Achse in wagrechte Stellung gebracht

---

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. **68**. 364 (1909).

[2]) Die Weite des Reagenzglases darf unter keinen Umständen unten größer als oben sein und muß der Größe des Stöpsels *D* (siehe Fig. 34) in der Weise genau angemessen sein, daß sie soweit als möglich dem Durchmesser des Stöpsels mitten am Schliffe gleich ist.

und die Rotation sechs bis acht Minuten fortgesetzt, wonach das Aufgießen wie das erstemal wiederholt wird.

Man gießt für gewöhnlich in dieser Weise viermal auf und gibt außerdem, um den oberen Saum des Häutchens zu verstärken, diesem einen Extraaufguß, während das Glas in wagrechter Stellung rotiert. Nach dem letzten Aufgießen wird das Häutchen eineinhalb bis zwei Stunden an der Luft getrocknet, und zwar so, daß das Umdrehen in wagerechter Stellung jedenfalls während der ersten halben Stunde fortgesetzt wird. Mittels eines scharfen Messers wird nun oben am Glas und ganz herum ein Ritz ins Kollodium geschnitten, das Glas mit Wasser gefüllt und das Ganze in Wasser gestellt, wodurch der nach dem Lufttrocknen noch im Häutchen zurückgebliebene Alkohol herausdiffundiert und durch Wasser ersetzt wird. Nach einigen Stunden kann man jetzt eine Luftblase unter den oberen Rand des Häutchens zwischen dieses und das Glas hineinbringen und durch vorsichtiges Reiben, am besten unter ununterbrochenem Zutröpfeln von Wasser, in eine Spirale bis zum Boden des Glases herunterführen und dadurch das Häutchen derart losmachen, daß es sich abziehen läßt, indem Wasser durchs Loch im Boden des Glases hineintritt und den Zwischenraum zwischen Glas und Häutchen ausfüllt.

Das Häutchen ist jetzt gebrauchsfertig; es kann aber, ohne seine Durchlässigkeit merklich zu ändern, in (toluolgesättigtem) Wasser oder in einer Salzlösung eine unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden; trocken darf es aber niemals werden, weil die Durchlässigkeit dadurch im wesentlichen verloren geht.

Wenn das Häutchen in die Dialysierzelle auf den Stöpsel *D* (Fig. 34) eingesetzt werden soll, wird es erst vorsichtig in der Mündung erweitert — wie man den Finger eines Handschuhes erweitert — entweder mittels des Fingers oder besser mittels einer angemessenen Lehre und dann an den untersten geschliffenen Teil des Stöpsels hineingeschoben. Hat man das Häutchen erst ein paar Millimeter auf den Schliff hineingebracht, dann hält man das Ganze derart unter einem tröpfelnden Wasserhahn, der es befeuchtet, daß das Häutchen nach vorn und nach unten zeigt, und jetzt zieht man das Häutchen an sich durch Reibung mit dem Daumen, indem man für jeden „Griff" das Ganze ein wenig dreht. In dieser Weise läßt sich das Häutchen nach und nach 1 bis 2 *cm* über den unteren Rand des Schliffes heraufziehen; das Anbringen des Häutchens ist aber eine etwas heikle Operation, die außer Vorsicht und Übung seitens des Arbeitenden noch verlangt, daß die Qualität des Häutchens gut ist, weil es sonst birst.

Ist das Häutchen jetzt aufgesetzt, hat man es nebst dem Stöpsel mit Wasser zu füllen und an seinen Platz in der Zelle einzu-

setzen[1]), um sodann, bevor man es in Gebrauch nimmt, zu untersuchen, einerseits ob der Apparat dicht und das Häutchen stark genug ist und andererseits wieweit die Durchlässigkeit des Häutchens eine angemessene ist. Das erste prüft man einfach dadurch, daß man die Zelle außerhalb und innerhalb des Häutchens mit Wasser anfüllt, das Rohr durch den Tubus *A* (Fig. 34) schließt und dann vorsichtig und nach und nach durch den Tubus *B* einen etwas größeren Unterdruck wirken läßt, als derjenige, bei welchem der Apparat später zu gebrauchen ist. Ist der Apparat undicht, so daß sich Luft am Stöpsel *D* hineinsaugt, dann kann diesem Fehler gewöhnlich durch Dichtung mittels etwas Vaselin abgeholfen werden; ist das Häutchen derart undicht, daß sowohl Wasser als Luft sich durchsaugen lassen, dann ist es wegzuwerfen; ist es zu schwach, zerspringt es während der Probe.

Die Durchlässigkeit des Häutchens hängt teils von seiner Wandstärke, teils von der Trocknungszeit zwischen den einzelnen Begießungen bei der Darstellung, besonders aber von der Zeit zwischen der letzten Begießung und der Anbringung in Wasser ab, und sie ist um so geringer, je länger die Trockenzeit gewesen ist.

Die Probe ist die folgende:

Die Zelle wird mit einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung als Innenflüssigkeit und reinem Wasser als Außenflüssigkeit beschickt und sodann während 24 Stunden bei demjenigen Minderdruck, welcher später anzuwenden ist, hingestellt.

Am nächsten Tage wird die Außenflüssigkeit mit reinem Wasser gewechselt, was an den zwei nachfolgenden Tagen wiederholt wird. Die drei Dialysate werden jedes für sich analysiert, und die Durchlässigkeit des Häutchens wird für passend erachtet, wenn das Ammoniumsulfat so leicht durchgegangen ist, daß im dritten Dialysat nur verhältnismäßig wenig Schwefelsäure nachzuweisen ist, und das Eieralbumin sich höchstens in Spuren in den Dialysaten vorfindet. Die Prüfung auf Eieralbumin macht man in 100 cm^3 des Dialysates durch Zufügung von 10 cm^3 n/1-Essigsäure und 10 cm^3 n/1-Natriumazetat mit nachfolgendem halbstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade. Entsteht bei dieser Behandlung mehr als ein ganz unbedeutender Niederschlag, ist das Häutchen zu verwerfen. Die Probe ist sehr fein, indem Kontrollversuche gezeigt haben,

[1]) Dieses läßt sich bisweilen ohne Schwierigkeit bewerkstelligen, gewöhnlich ist aber der Durchmesser des Häutchens so groß, daß das folgende Verfahren eingeschlagen werden muß. Wie oben wird das Häutchen mit Wasser gefüllt und dessen unteres Ende in die Öffnung der Zelle angebracht. Indem man das Häutchen mit der linken Hand stützt, hebt man das Ganze ein wenig vom Tisch, worauf es steht, und läßt es dann fallen. Nachdem man diese Manipulation einigemal wiederholt hat, sinkt das wassergefüllte Häutchen wegen seines Gewichtes an seinen Platz hinunter.

daß selbst so kleine Eieralbuminmengen wie diejenien, die 0·1 bis 0·2 *mg* Proteinstickstoff entsprechen, in dieser Weise eine schwache Opaleszenz und einen bleibenden Schaum geben. Es kommt bisweilen vor, daß ein Häutchen in den ersten 24 Stunden ein wenig Albumin durchgehen läßt, aber diese Durchlässigkeit während der Probe verloren geht; ein solches Häutchen ist natürlich vollends brauchbar. Ist eine Dialysierzelle einmal probiert und in Ordnung, dann kann sie jahrelang gebraucht werden; nur muß man dafür Sorge tragen, daß sie nach jedem Gebrauch gut gereinigt wird, daß sie nie trocken wird, und daß sie, um steril zu bleiben, in toluolgesättigtem Wasser oder gesättigter Ammoniumsulfatlösung und damit gefüllt aufbewahrt wird.

3. Prüfung auf Schwefelsäure.

Prüfung im Dialysat. Zu 1 *l* Dialysat werden 2 cm^3 n/1-Natriumazetatlösung und 2 cm^3 n/1-Essigsäure zugesetzt, worauf im Vakuum in einem sorgfältig gereinigten Kolben, der mit einem ausgekochten Korkpropf und gut gereinigten Glasröhren montiert ist, eingedampft wird. Die während des Einengens durch das Kapillarrohr eintretende Luft passiert zuerst eine kleine Waschflasche mit Natriumhydroxydlösung, um von schwefliger Säure befreit zu werden. Nach Einengung bis auf einige wenige Kubikzentimeter wird durch ein kleines, gut ausgewaschenes Filter in ein Reagenzglas filtriert und der Kolben und das Filter mit reinem Wasser gewaschen, so daß das gesamte Volumen des Filtrates etwa 15 cm^3 beträgt. Hiezu werden unter gutem Schütteln fünf Tropfen 2/n-Bariumchloridlösung gegeben und die dadurch eventuell entstehende Trübung mit der Trübung einer Reihe gleichzeitig zubereiteter Kontrollösungen verglichen. Jede Kontrollösung enthält 2 cm^3 n/1-Natriumazetatlösung + 2 cm^3 Essigsäure + a cm^3 n/100-Schwefelsäure + $(11 \div a)$ cm^3 Wasser nebst fünf Tropfen Bariumchloridlösung; a variiert von 0 bis 2.

Prüfung in der Eieralbuminlösung. 50 cm^3 Eieralbuminlösung werden mit 200 bis 300 cm^3 Wasser vermischt und unter gutem Schütteln mit 2 cm^3 n/1-Natriumhydroxydlösung versetzt. Nach Stehenlassen eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur werden 4 cm^3 n/1-Essigsäure zugegeben und dann unter gutem und wiederholtem Schütteln durch Erhitzung auf siedendem Wasserbade drei viertel Stunden das Albumin zum Koagulieren gebracht. Der Niederschlag wird auf einem gut gewaschenen Filter abfiltriert und einigemal mit Wasser gewaschen, wonach Filtrat und Waschwasser im Vakuum eingedampft und ganz wie oben behandelt wird.

Kontrollversuche, die teils an reinem Wasser und teils an einer Eieralbuminlösung, die durch langdauernde Dialyse, während welcher Ammoniak mehreremal zugegeben wurde, vollständig von Schwefelsäure befreit war, ausgeführt waren, haben gezeigt, daß die Grenze der Empfindlichkeit des hier beschriebenen Verfahrens bei 0·2 bis 0·3 *cm*³ n/100-Schwefelsäure liegt, indem kleinere Schwefelsäuremengen nicht mit Sicherheit nachzuweisen sind. Weiter hat sich herausgestellt, daß die (quantitative) Schätzung der vorhandenen Menge Schwefelsäure mittels des oben beschriebenen Vergleiches zwischen der zu untersuchenden Probe und den Kontrolllösungen von bekanntem Säuregehalt sich bei Mengen von 0·2 bis 2 *cm*³ n/100-Schwefelsäure einigermaßen genau gestaltet, während Mengen von 2 bis 4 *cm*³ den Vergleich unsicherer und größere Mengen ihn beinahe unmöglich machen.

Diese Kontrollversuche erlauben uns den Schluß zu ziehen, daß Dialysate oder Eieralbuminlösungen, die bei der Schwefelsäureprobe eine klare Lösung geben oder eine Unklarheit zeigen, die kleiner ist als diejenige einer Kontrollösung mit 0·3 *cm*³ n/100-Schwefelsäure, entweder schwefelsäurefrei sind oder jedenfalls in der zur Probe verwendeten Menge höchstens 0·3 *cm*³ n/100-Schwefelsäure enthalten.

4. Verlauf der Dialyse.

Zum besseren Verständnis des Dialysierprozesses mögen die Einzelheiten eines der Versuche, dessen ganzer Verlauf durch quantitative Bestimmungen in den Dialysaten verfolgt wurde, hier angeführt werden.

610 *g* toluolhaltige Eieralbuminlösung mit einer 12·6 *g* Proteinstickstoff entsprechenden Menge Eieralbumin und einem 16·204 *g* Ammoniakstickstoff entsprechenden Gehalt an Ammoniumsulfat wurden am 11. September 1914 in die sechs Zellen des Apparates verteilt, wodurch die Häutchen halb voll wurden. Die Oberflächen der Innenflüssigkeit wurden mit Toluol überschichtet. Das gesammelte erste Dialysat, d. h. die Dialysate von den ersten drei Auswechslungen (11. bis 12. September), wog 19130 *g*. Der Ammoniakgehalt wurde so genau wie möglich in drei abgewogenen Proben, jede von 30 *g*, bestimmt; das gesamte Dialysat enthielt 14·912 *g* Ammoniakstickstoff oder 92·03% der ganzen Menge. Das zweite, dritte und vierte Dialysat wurden in derselben Weise behandelt: Die folgenden Dialysate wurden gemessen und das Ammoniak aus aliquoten Teilen abdestilliert und nach *Neßler* bestimmt (siehe S. 631); das Resultat war folgendes:

	Gewicht oder Volumen des Dialysates	Gehalt an Ammoniakstickstoff	
		in g	in Prozent d. Gesamtammoniakstickstoffes
Erstes Dialysat (11./9. bis 12./9.)	19130 g	14·912	92·03
Zweites „ (12./9. „ 13./9.)	17370 „	1·015	6·26
Drittes „ (3./9. „ 14./9.)	17850 „	0·137	0·85
Viertes „ (14./9. „ 15./9.)	17700 „	0·044	0·27
Fünftes „ (15./9. „ 16./9.)	17730 cm^3	0·0226	0·14
Sechstes „ (16./9. „ 17./9.)	17770 „	0·0111	0·07
Siebentes „ (17./9. „ 18./9.)	18140 „	0·0096	0·06
Achtes „ (18./9. „ 19./9.)	16220 „	0·0050	0·03
Zusammen...		16·1563	99·71

Im achten Dialysat wurde außerdem der Schwefelsäuregehalt bestimmt, und es wurde gefunden, daß 1 l Dialysat 1·2 cm^3 n/100-Schwefelsäure enthielt.

Am 19. September nahm man den Apparat auseinander, indem der Unterdruck in den Zellen beibehalten wurde, entleerte den Inhalt der Zellen mittels eines als Heber wirkenden gut ausgekochten Kautschukschlauches in eine Flasche und gab ihm dann nach und nach unter gutem Schütteln so viel Ammoniak zu, daß die Reaktion der Flüssigkeit gegen Lackmuspapier schwach, aber deutlich alkalisch wurde (23·2 cm^3 n/1-Ammoniak war notwendig). Nach erneuertem Schütteln wurde die Eieralbuminlösung wieder in die Häutchen gebracht, der Trichter mit ein wenig ausgekochtem Wasser gespült, ein wenig Toluol zugegeben und die Dialyse fortgesetzt.

Im folgenden (neunten) Dialysat wurde nicht nur — was zu erwarten war — mehr Ammoniak als im achten gefunden, sondern auch mehr Schwefelsäure, und zwar im ganzen 0·0154 g Ammoniakstickstoff und in 1 l etwa 6 cm^3 n/100-Schwefelsäure; schon im nächstfolgenden (zehnten) Dialysat aber fanden sich nur im ganzen 0·0066 g Ammoniakstickstoff und in 1 l 0·6 cm^3 n/100-Schwefelsäure.

Die Dialyse wurde jetzt bis zum 30. September fortgesetzt, und während dieser Zeit nahm der Gehalt des Dialysates an Ammoniak ganz langsam von 0·0066 bis zu 0·0041 g Ammoniakstickstoff ab. Schwefelsäure war nur in den Dialysaten der ersten Tage nachweisbar, in denen der späteren dagegen nicht.

Am 30. September wurde der Apparat wieder auseinander genommen, Ammoniak wie oben zugegeben, bis die Eieralbuminlösung schwach, aber deutlich alkalisch gegen Lackmuspapier reagierte (gebraucht 5 *cm*³ n/1-Ammoniak) und die Dialyse wieder bis zum 7. Oktober fortgesetzt. Der Gehalt an Ammoniakstickstoff der Dialyse dieser Periode fiel gleichmäßig von 0·0126 bis auf 0·0052 *g*. 1 *l* des Dialysates des ersten Tages (30. September bis 1. Oktober) enthielt 0·4 *cm*³ n/100-Schwefelsäure; in den späteren Dialysen war Schwefelsäure nicht nachzuweisen.

Die Dialyse wurde am 7. Oktober abgebrochen, und die Häutchen wurden entleert; trotz des angewandten Minderdruckes (25 *cm* Quecksilber) hatte das Volumen der Eieralbuminlösung sich bedeutend vergrößert, indem die Innenflüssigkeiten die Häutchen füllten und in die Trichter hinauf standen; das Gesamtvolumen betrug etwas mehr als 1400 *cm*³. In 50 *cm*³ der Eieralbuminlösung war Schwefelsäure nicht nachzuweisen. 100 *cm*³ der Lösung enthielten 837·6 *mg* Proteinstickstoff und 23·0 *mg* Ammoniakstickstoff.

Aus diesem typischen Beispiel des Verlaufes einer Dialyse ist erstens zu ersehen, daß weitaus der größte Teil des Ammoniumsulfates sehr schnell hinausdialysiert, zweitens aber auch, daß es sehr schwierig, wahrscheinlich sogar unmöglich sein wird, die letzten Spuren der beiden Bestandteile zu entfernen, selbst durch langdauernde Dialyse. Es ist ebenfalls ersichtlich, daß die Zufügung des Ammoniaks zu der Eieralbuminlösung die Schwefelsäuremenge im Dialysate vergrößert (die ersten Ammoniakzugaben von 1·2 bis 6 *cm*³ n/100-Schwefelsäure, die letzte von 0 bis 0·4 *cm*³). Da ein Ammoniakzusatz den osmotischen Druck der Albuminlösung bedeutend vergrößert, so ist ein Minderdruck von 25 *cm* Quecksilber nicht groß genug, um eine Verdünnung der Innenflüssigkeit völlig zu hindern. Diesem Mangel kann indessen zum Teil dadurch abgeholfen werden, daß die Dialyse noch länger als in dem oben beschriebenen Beispiel fortgesetzt wird, indem das Ammoniak nach und nach, aber in allmählich abnehmenden Mengen wegdialysiert, was den osmotischen Druck der Eieralbuminlösung verringert, so daß eine entsprechende Wegsaugung von Wasser vor sich geht; um das zu erreichen, muß man aber noch Wochen lang die Dialyse fortsetzen.

5. Wird das Eieralbumin während der Dialyse verändert?

Unter den Faktoren, welche gewöhnlich und mit Recht als von Bedeutung für die Eigenschaften einer kolloiden Lösung genannt werden, sind das Alter und die Vorgeschichte derselben.

Da es unmittelbar einleuchtend ist, daß Untersuchungen wie diejenigen, über welche hier berichtet wird, nur von wenig Nutzen sein würden, falls die Eigenschaften des Ausgangsmaterials, der Eieralbuminlösung, sich während der Aufbewahrung änderten, so mußte es nach Möglichkeit dargetan werden, daß die Eieralbuminlösungen keinerlei Veränderungen erleiden, wenn sie mit der notwendigen Sorgfalt aufbewahrt und behandelt werden. Es hat sich nun gezeigt, daß die wichtigste Quelle der Umwandlungen von Eieralbuminlösungen in der Wirksamkeit der Mikroorganismen zu suchen ist. Verhindert man diese Tätigkeit durch reichliche Anwendung von Toluol, oft wiederholtes Umschütteln und Aufbewahrung der Lösungen in Eis in einem Eisschrank, dann ist es möglich, die ursprünglichen und für das betreffende Albumin charakteristischen Eigenschaften einer Eieralbuminlösung unverändert monatelang zu bewahren. Auch während der Dialyse verändert sich das Eieralbumin nicht, sofern die obengenannten Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden. Dieses zeigt sich am deutlichsten dadurch, daß der osmotische Druck einer dialysierten und nachher mit Ammoniumsulfat versetzten Eieralbuminlösung und der einer nicht dialysierten mit demselben Ammoniumsulfatgehalt unter übrigens denselben Umständen ganz derselbe ist. Und eben durch die Messung des osmotischen Druckes läßt sich eine angefangene, ganz geringfügige Spaltung scharf und sicher nachweisen.

Es wurde auch untersucht, ob eine der charakteristischen Eigenschaften einer Eieralbuminlösung, nämlich die Fähigkeit, sich durch Zugabe von Ammoniumsulfat kristallinisch auszuscheiden, während der Dialyse verändert wird. Es hat sich dabei herausgestellt, daß eine in normaler Weise dialysierte Eieralbuminlösung durch Zusatz von etwas Ammoniumsulfat und ein wenig Impfmaterial beinahe eben so vollständig wie eine nicht dialysierte auskristallisiert. Nicht kristallisierbares Albumin ist somit während der Dialyse nicht in nennenswerten Mengen gebildet worden. Auf der anderen Seite, wenn es sich ereignet, daß eine Eieralbuminlösung infolge wenig sorgfältiger Behandlung, z. B. Stehenlassen während einiger Tage bei Zimmertemperatur ohne wesentlichen Gehalt an Ammoniumsulfat oder an Toluol, durch Fäulnisbakterien angegriffen wird, was sich immer nach Austreibung des Toluols mittels eines Wasserstoffstromes durch den Geruch verrät, dann wird ein wesentlicher Teil des kristallisierbaren Albumins in nicht kristallisierbares umgewandelt worden sein, selbst wenn die Spaltung nur so weit vorgeschritten ist, daß nicht mehr als ganz unbedeutende Mengen des Proteinstoffes in nicht koagulierbare Körper verwandelt worden sind. Die Um-

Tabelle 11.

Ammoniumsulfatlösungen,

die in 100 g Wasser $S\,g$ Ammoniumsulfat enthalten, haben bei 18° ein spezifisches Gewicht, d_s, auf Wasser von 4° bezogen, ein Volumen, V_s, von demjenigen Gewicht der Lösung, das 100 g Wasser enthält; $V_s = \frac{100 + S}{d_s}$

eine Äquivatentkonzentration, c; $c = \frac{1000\,S}{V_s \times 66{\cdot}08}$.

S	d_s	V_s	c	S	d_s	V_s	c
0	0·99864	100·136	0·00000	31	1·13574	115·342	4·06723
0·2	0·99985	100·215	0·03020	32	1·13907	115·884	4·17880
0·6	1·00221	100·378	0·09046	33	1·14233	116·428	4·28925
0·1	1·00458	100·540	0·15052	34	1·14555	116·974	4·39860
1·5	1·00748	100·746	0·22531	35	1·14872	117·522	4·50686
2	1·01034	100·956	0·29979	36	1·15184	118·072	4·61403
3	1·01595	101·383	0·44780	37	1·15492	118·624	4·72013
4	1·02141	101·820	0·59450	38	1·15794	119·177	4·82521
5	1·02674	102·265	0·73989	39	1·16093	119·732	4·92923
6	1·03197	102·716	0·88397	40	1·16386	120·289	5·03221
7	1·03709	103·173	1·02673	41	1·16675	120·848	5·15978
8	1·04212	103·635	1·16818	42	1·16960	121·409	5·23508
9	1·04704	104·103	1·30829	43	1·17242	121·971	5·33503
10	1·05187	104·576	1·44710	44	1·17518	122·535	5·43397
11	1·05660	105·054	1·58455	45	1·17790	123·100	5·53197
12	1·06125	105·536	1·72070	46	1·18058	123·667	5·62897
13	1·06582	106·022	1·85555	47	1·18323	124·236	5·72500
14	1·07030	106·512	1·98909	48	1·18585	124·806	5·82010
15	1·07470	107·007	2·12131	49	1·18841	125·377	5·91430
16	1·07901	107·506	2·25223	50	1·19095	125·950	6·00754
17	1·08325	108·008	2·38187	51	1·19345	126·524	6·09989
18	1·08743	108·513	2·51024	52	1·19591	127·100	6·19131
19	1·09153	109·021	2·63735	53	1·19835	127·677	6·28186
20	1·09556	109·533	2·76319	54	1·20073	128·255	6·37154
21	1·09952	110·048	2·88777	55	1·20310	128·834	6·46037
22	1·10341	110·566	3·01111	56	1·20543	129·414	6·54835
23	1·10724	111·087	3·13321	57	1·20773	129·996	6·63544
24	1·11100	111·611	3·25409	58	1·20999	130·580	6·72166
25	1·11471	112·137	3·37377	59	1·21221	131·165	6·80705
26	1·11836	112·665	3·49228	60	1·21441	131·751	6·89164
27	1·12194	113·196	3·60959	61	1·21658	132·338	6·97542
28	1·12548	113·729	3·72573	62	1·21872	132·926	7·05841
29	1·12895	114·264	3·84073	63	1·22084	133·515	7·14061
30	1·13238	114·802	3·95455	64	1·22292	134·105	7·22204

bildung des kristallisierbaren in nicht kristallisierbares Albumin scheint demnach das erste Stadium des Abbaues desselben zu repräsentieren[1]).

---

[1]) Es würde somit naheliegend sein, das Konalbumin des natürlichen Eiweißes als ein Abbauprodukt des kristallisierbaren Eieralbumins, das öfters „Ovalbumin" genannt wird, zu betrachten. Daß frischgelegte Eier eine bessere Ausbeute an kristallisiertem Eieralbumin geben als solche, die längere Zeit hindurch aufbewahrt gewesen, würde damit auch in gutem Einklang stehen.

Umwandlungsprodukte der Proteine.

Von **Eduard Strauss**, Frankfurt a. Main.

„Umwandlungsprodukte der Proteine" sind Derivate, die zwar noch Proteincharakter besitzen, aber durch spaltende oder aufbauende Eingriffe mittels anorganischer oder organischer Agentien mehr oder minder tiefgreifende Veränderungen gegenüber ihren Ausgangssubstanzen aufweisen. Solche nach bestimmtem Plan herbeigeführten Veränderungen sollen von der Seite des Molekularganzen her eine Einsicht in den Bau der Proteine vermitteln und Schlüsse auf den „Bauplan" zulassen, während die Totalhydrolyse die „Bausteine" aufzeigt. Diesem Zwecke dienen die „Zahlen" der neueintretenden Komponenten (Jodzahl, Methylzahl, Azetylzahl, Benzoylzahl), die zusammen mit anderen Methoden messenden Charakters (Formoltitration nach *Soerensen*, *van Slyke*-Stickstoff) auf Bindungsverhältnisse, freie oder freiwerdende Gruppen und Molekulargröße schließen lassen. Weiter sind die Umwandlungsprodukte durch „Markierungen" an bestimmten hydrolytischen Spaltprodukten, durch den Fortfall typischer Gruppenreaktionen und schließlich durch Veränderungen im biologischen Charakter von Bedeutung. Der Erkenntniswert der verschiedenen Produkte und Methoden kann durch die Verbindung mehrerer Methoden am gleichen, möglichst einheitlich dargestellten Protein erhöht werden.

I. Proteine mit anorganischen Komponenten.

1. Halogenproteine.

Künstliche Halogenproteine entstehen, wenn man Halogene auf Proteine einwirken läßt: Hiebei werden größere oder geringere Mengen von Halogenwasserstoffsäure gebildet, die ihrerseits verändernd auf das Produkt wirken; außerdem verlaufen als Nebenreaktionen Oxydationsprozesse am Proteinmolekül. Die Aufgabe ist, bei vollkommener Substitution aller halogenbindenden Kerne die verändernden Nebenreaktionen auf ein Minimum einzuschränken. Als Hauptträger der Halogenisierung darf heute das Tyrosin (neben Histidin; Phenylalanin ist fraglich) angesprochen werden. Dem

entspricht das Fehlen der *Millon*-Reaktion (*F. Blum* und *W. Vaubel*[1]). Daneben deuten auf oxydative Veränderungen das Fehlen der Schwefelbleireaktion (Zystin) und der Reaktion nach *Neubauer-Rhode* (Tryptophan). Bei maximaler Jodaufnahme ist nicht alles Jod am Kohlenstoff, sondern ein genau bestimmbarer Teil am (basischen) Stickstoff gebunden (vgl. Späteres).

Es gibt im wesentlichen zwei verschiedene Methoden zur Gewinnung von Halogen- (speziell Jod-) Proteinen: Die eine — von *Blum* und *Vaubel* ausgearbeitete — arbeitet in neutraler bezw. schwach alkalischer (Bikarbonat-) Lösung, die andere — von *F. Hofmeister*[2]) und *D. Kurajeff*[3]) beschriebene — arbeitet unter Zusatz von JO_3K oder in saurer Lösung; hieher gehört auch die Methode von *F. G. Hopkins* und *S. N. Pinkus*[4]): Ohne in die Diskussion über die Verschiedenheit der Produkte beider Methoden einzutreten, seien die Arbeitsweisen geschildert. Betreffs der zahlenmäßigen Ergebnisse („Jodzahlen") sind die Originalarbeiten zu vergleichen.

a) Methode von *F. Hofmeister*.

Ungefähr 5·0 *g* kristallisiertes Serumalbumin werden mit 2·0 *g* JK, 1·0 *g* J und 0·05 *g* JO_3K in 250 cm^3 Wasser zusammengebracht. Unter häufigem Umschütteln bleibt die Mischung drei Tage lang bei 40 bis 50° stehen. Am zweiten Tag bildet sich ein brauner, voluminöser Niederschlag. (Die über demselben stehende Flüssigkeit ist je nach der Anwesenheit eines Jodüberschusses mehr oder weniger gelb gefärbt.) Der Niederschlag des gebildeten Jodproduktes wird abfiltriert und so lange eiweißfrei gewaschen, bis die ablaufenden Flüssigkeiten keine Trübungen nach Ammonsulfatsättigung mehr geben. Alsdann reinigt man den Körper durch mehrfache Umfüllung aus schwach ammoniakalischer Lösung mit verdünnter Essigsäure. Den zuletzt entstandenen Niederschlag sammelt man auf Seidenfilter, wäscht aufs neue mit Wasser, 95%igem Alkohol und Äther, bis die Waschflüssigkeiten keinerlei Reaktion auf Jod, bezw. Jodwasserstoffsäure mehr geben. Zur Analyse trocknet man bei 110°.

Durch Variation der Jodzufuhr und der Einwirkungszeit gelangt man zu jodreicheren und jodärmeren Präparaten. Im all-

---

[1]) *F. Blum* und *W. Vaubel*: Über Halogeneiweißderivate I. Journ. f. prakt. Chem. N. F. **56**. 393 (1897); II. ibid. **57**. 365 (1898).

[2]) *F. Hofmeister*: Untersuchungen über Proteinstoffe. Über jodiertes Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 159 (1898).

[3]) *D. Kurajeff*: Über Einführung von Jod in das kristallisierte Serum- und Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 462 (1899). Siehe dort auch ältere Literatur.

[4]) *F. G. Hopkins* und *S. N. Pinkus*: Zur Kenntnis der Einwirkung der Halogene auf Proteine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**. 1312 (1898).

gemeinen genügt der Zusatz von 1 *g* Jod auf 2 *g* Eiweiß, um, soweit es die Methode zuläßt, eine maximale Jodaufnahme zu erzielen.

Im Falle einer Jodierung bei saurer Reaktion setzt man der Eiweißlösung Jodkalium, jodsaures Kalium und so viel Schwefelsäure hinzu, als die Reaktion nach der folgenden Formel verlangt:

$$10\,KJ + 2\,HJO_3 + 5\,H_2SO_4 = 6\,J_2 + 5\,K_2SO_4 + 6\,H_2O.$$

Das Ausfällen des gebildeten Jodproduktes erfolgt bei saurer Reaktion der Lösung meist früher als bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion.

b) Methode von *F. G. Hopkins* und *S. N. Pinkus.*

Man läßt Jod auf eine 1%ige Eiweißlösung bei 40°, Chlor oder Brom bei Zimmertemperatur einwirken. Alsbald entstehen beim Steigern des Halogenzusatzes dicke Niederschläge, die auf dem Filter eiweiß- und halogenfrei gewaschen werden.

Diese Substanzen bestehen anscheinend aus mehreren Halogenproteinen. Zu ihrer Trennung löst man die Niederschläge noch vor dem Trocknen in einer 1%igen Sodalösung und fällt durch verdünnte Essigsäure in Form eines weißen, flockigen Niederschlages (Gruppe I). Derselbe wird auf dem Filter mit Wasser gewaschen (ein geringer Anteil ist in Wasser löslich), mit Alkohol entwässert und im Vakuum getrocknet.

Eine Gruppe II eines anders zusammengesetzten Proteins gewinnt man aus dem Rohprodukt des Halogeneiweiß, indem man das Rohprodukt noch feucht, aber doch genügend von Wasser befreit, sorgfältig mit Alkohol anreibt, mit genügendem Alkohol verdünnt und dann auf dem kochenden Wasserbad schnell zum Sieden erhitzt. Das gesamte Rohprodukt geht hiebei in Lösung. Man gebraucht für 6 *g* etwa 100 cm^3 Alkohol. Die alkoholischen Lösungen läßt man durch einen Heißwassertrichter in abgekühlten Äther fließen. Das ausfallende Produkt wird auf dem Filter mit Äther gewaschen und in vacuo getrocknet.

Hopkins und *Pinkus* haben auch in ganz schwach essigsaurer Lösung jodiert.

Mit älteren Versuchen von *Liebrecht*[1]) sind neuere Jodierungen zu vergleichen, die *A. Krzemecki*[2]) ausgeführt hat. Er jodierte, bezw. bromierte koagulierte Proteine in Äther bezw. Methylalkohol und behandelte die erhaltenen Produkte mit siedender konzentrierter Essigsäure oder mit Azeton oder Natriumthiosulfat bei gewöhnlicher Temperatur.

---

[1]) *Liebrecht*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 1824 (1895).

[2]) *A. Krzemecki*: Über Jod- und Bromeinwirkung auf Proteinkörper. Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau, Reihe A, 1911, S. 470.

c) Methode von *F. Blum* und *W. Vaubel.*

Diese Jodierungsmethode entspricht der unter *A*) wiedergegebenen Arbeitsweise in allen wesentlichen Punkten; sie ist neuerdings von *F. Blum* und *E. Strauss*[1]) weiter ausgebaut worden, wobei es gelang, neben den „maximal", d. h. sowohl am Kohlenstoff wie am basischen Stickstoff jodierten Proteinen Produkte ohne Stickstoffjodierung zu erhalten, so daß von einer „doppelten Jodzahl" (*A* und *B*) gesprochen werden kann: Die beiden Zahlen stehen in einem gesetzmäßigen Zusammenhang. Daneben können durch eine Modifikation der Methode Jodproteine mit voller Kernjodzahl (*B*) erhalten werden, die im Gegensatz zu allen nach anderer Methode dargestellten Substanzen optimale Konservierung des Zystins und des Tryptophans (positive Schwefelbleiprobe und positive Bk. nach *Neubauer-Rhode*) zeigen (*C*).

A. Maximale Jodierung (*A-Zahl*).

Als Ausgangsmaterial dienen reinste ausdialysierte Proteinlösungen ohne jegliche vorherige Koagulation. Nach Zusatz von reinem $NaHCO_3$ (auf Abwesenheit von Soda ist sorgfältig zu achten!) werden die Lösungen auf Brutschranktemperatur (37·5°) gebracht und mit einem Überschuß einer 2 n-Jodjodkalilösung versetzt. Die Jodierung bei dieser Temperatur gilt als beendet, wenn das Jod (man setze zuletzt immer kleinere Portionen zu!) nicht mehr verschwindet. Bei Anwendung 2%iger Proteinlösungen in Mengen von 200 bis 300 cm^3 ist dies innerhalb von 24 Stunden der Fall. Wenn man bei einer Temperatur von 40 bis 45° jodiert, so genügt bereits eine viel kürzere Zeit.

Häufiges Umschütteln ist nötig. Allzulange Dauer der Jodierung, vor allem aber höhere Temperaturen, sind zu vermeiden. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt, mit Thiosulfat vom Jodüberschuß befreit und mit 10%iger Essigsäure angesäuert. Ist alle Kohlensäure entwichen, so fügt man bis zu abermaliger klarer Lösung (bei Serumglobulin tritt diese nicht ein) stark verdünnte Natronlauge zu, filtriert rasch durch Absaugen auf einer mit Papierwolle gefüllten Nutsche und fällt mit 10%iger Essigsäure aus.

Das meist hellgelb gefärbte Produkt wird durch anhaltendes Waschen mit Wasser, Behandlung mit 80%igem Azeton, dann mit absolutem Azeton in der Kälte gereinigt, mit Azeton oder Alkohol einmal kurz aufgekocht, mit Äther gewaschen und durch Aufstreichen auf Ton rasch getrocknet. Man erhält so hellgelbe staubfeine Pulver.

[1]) *F. Blum* und *E. Strauss*, *E. Strauss* und *R. Gruelzner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 111 bis 175 [1921].

B. „*Kernjodierte*“ *Proteine* (*B-Zahl*).

Das mit Wasser gründlich gewaschene Produkt der kompletten Jodierung wird in wenig Natronlauge (oder Ammoniak) gelöst und mit schwefliger Säure gefällt. Man kann dies einfach so bewirken, daß man der gelösten Substanz 1 bis 2 *g* reinstes Natriumbisulfat zusetzt und dann mit Schwefelsäure (1:4) ausfällt. Lösung und Fällung werden so oft wiederholt, bis das Gesamtfiltrat einer Fällung kein freies Jod mehr enthält. (Längere Einwirkung der schwefligen Säure, gründliches Auswaschen vor jeder neuen Umfällung!) Man muß diese Filtrate vor dem Ausführen der Nitritprobe mit wenig Phosphorwolframsäure von etwa gelöster Substanz befreien. Zur Ausführung der Nitritprobe ist viel Nitrit nötig, um zuerst die schweflige Säure zu zerstören. Die restlose Entfernung abspaltbaren, an basischen Stickstoff gebundenen Jods[1]) — das aber von dem bereits bei *A* entfernten anhaftenden Jodwasserstoffjod wohl zu unterscheiden ist — pflegt nach sechs- bis siebenmaliger Umfällung erreicht zu sein. Sodann wird die Substanz „*B*“, die jetzt nur noch an Kohlenstoff gebundenes Jod enthält, zwei- bis dreimal aus verdünnter Natronlauge mit 10%iger Essigsäure umgefällt und ebenso wie die Substanzen der „*A*“-Reihe gereinigt und getrocknet. Die Farbe der *B*-Substanzen ist fast weiß.

C. *Konservierende Jodierung.*

Jodproteine mit vollkommener Kernjodierung (Millon negativ, Jodzahl = *B*), aber erhaltener Schwefelblei- und Tryptophanreaktion erhält man durch schnelle Jodierung bei 40 bis 45° in sechs bis neun Minuten; der Vorgang ist im übrigen der gleiche wie bei *A* und *B*. Zur vollkommenen Ausfällung ist ein Zusatz von Natriumsulfat (2 bis 3 *g* in Substanz) von Nutzen. Die Substanzen der „*C*“-Reihe brauchen nur ein- bis zweimal mit schwefliger Säure behandelt zu werden. Man bringt vorteilhafterweise stets kleinere Portionen der Proteinlösung zur Jodierung und wählt den Überschuß der zuzufügenden Jodmenge nicht zu groß. Die optimalen Bedingungen müssen im Einzelfall ausprobiert werden.

Nach der Umfällung des völlig weißen Produktes aus verdünnter Lauge mit Essigsäure koaguliert man mit 80%igem Azeton und verfährt weiter, wie für *A* und *B* angegeben.

Es sei hier angemerkt, daß der Bikarbonatzusatz bei dieser Art der Jodierung nicht durch ein anderes Alkali (etwa $MgCO_3$) vertretbar ist. Jedes Erhitzen der Jodproteine mit Wasser (etwa

[1]) Vgl. dazu *Pauly*: Über die Jodeiweiße. Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**. 291.

Auswaschen mit heißem Wasser) ist, eintretender Stickstoff- und Jodverluste wegen, zu vermeiden.

Die Chlorierung bezw. Bromierung der Proteine geschieht in der Weise, daß man Chlor- bezw. Bromwasser zur Proteinlösung zusetzt und das Gemisch durch langsames Zutröpfeln von stark verdünnter Natronlauge unter gleichzeitigem Umrühren nahezu neutral hält (Bikarbonat wird durch Brom schon in der Kälte etwas zerlegt).

2. Azoproteine und Desaminoproteine.

„Azoprodukte" und sogenannte „Desaminoproteine" entstehen durch Einwirkung von salpetriger Säure auf Proteinlösungen. (Über die Bestimmung freier Aminogruppen nach der Methode von *D. D. van Slyke* vgl. dieses Handbuch.) Die Bildung von Azoprodukten und darauffolgende Kupplung derselben mit Phenolen ist als Farbreaktion der Proteine bekannt[1]).

a) Ein Azoprodukt des Ovalbumins gewinnt man nach *Treves* und *Salomone*[2]) durch Einwirken von 200 cm^3 einer 10%igen $Na\,NO_2$-Lösung und Salzsäure auf 50 *g* Ovalbumin bei 0°. Es bildet sich eine körnige, schwach gelbgefärbte Substanz, die sich an Luft und Licht allmählich rot färbt. Das Produkt, in kaltem Wasser und Alkali quellbar, aber nicht löslich, wird durch Säure aus warmem Alkali (braune Lösung) ausgefällt. Es bildet durch Kupplung mit Phenolen rote Farbstoffe und gibt keine Millonreaktion. Nach *Obermayer* (l. c.) bringt man 200 cm^3 Proteinlösung mit 50 *g* $Na\,NO_2$ und 200 cm^3 10%iger Schwefelsäure in Reaktion und überläßt das Gemisch 24 Stunden im Dunkeln sich selbst. Sodann wird das Diazoprodukt durch Eingießen in viel Wasser abgeschieden, die an der Flüssigkeitsoberfläche sich sammelnde gelbe Substanz abgehoben und nach Auswaschen zum Trocknen gebracht.

b) Die älteren Darstellungsmethoden der Desaminoproteine sind in letzter Zeit von *Skraup*[3]) ausgebaut und ergänzt worden.

Darstellung von Desaminokasein. 100 *g* Kasein werden mit 140 cm^3 Eisessig unter starkem Schütteln übergossen, eine halbe Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und dann mit dem doppelten Volumen kochenden Wassers versetzt. Unter Erwärmen und Schütteln geht dann das ganze Protein in Lösung. Zu der erkalteten Lösung läßt man langsam eine Lösung von 80 *g* $Na\,NO_2$

[1]) *Landsteiner*: Zentralbl. f. Physiol. **8.** 773; **9.** 433 (1895); *Obermayer*: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27.** 354 (1894).

[2]) *Treves* und *Salomone*: Biochem. Zeitschr. **7.** 11 (1907); **10.** 245 (1908).

[3]) *Zd. H. Skraup* und *Ph. Hoernes*: Über Desaminokasein. Monatsh. f. Chem. **27.** 631 (1906); *Skraup*: Über Desaminoglutin. Ibid. **27.** 653 (1906); *Skraup* und *H. Lampel*: Über Desaminoglutin. II. Ibid. **28.** 625 (1907); *W. Traxl*: Über Desaminoglobulin. **28.** 59 (1907).



in 1000 *cm*³ Wasser zufließen. Während dieser Prozedur ist der Kolben vor Außenluft verschlossen, und gleichzeitig geht ein Kohlensäurestrom durch das Reaktionsgemisch. Unter gleichzeitiger, oft beträchtlicher Gasentwicklung bildet sich durch das zutropfende Nitrit ein weißer Niederschlag, die überstehende Flüssigkeit färbt sich gelb. Nach Verbrauch der gesamten Nitritmenge läßt man vier Stunden stehen und erwärmt dann bis zur Beendigung einer Gasentwicklung am Wasserbad. (Starkes Schäumen! Daher große Kolben verwenden, 10 *l*!) Beim Erwärmen dunkelt das Reaktionsgemisch, der Niederschlag wird körnig. Derselbe wird heiß auf Leinwandfilter übertragen und mit heißem und kaltem Wasser bis zur Neutralität des Filtrates gewaschen. Hierauf entwässert man mit Alkohol und entfettet mit Äther im *Soxhlet*-Apparat.

Ausbeute: Aus 100 *g* Kasein 70 *g* Desaminokasein.

Für die Darstellung von Desaminoglutin und Desaminoglobulin müssen einige technische Modifikationen des Verfahrens berücksichtigt werden:

Für Glutin. 200 *g* Glutin versetzt man mit (1000 *cm*³) heißem Wasser, dann wird auf 2 *l* verdünnt. Zu der kalten Lösung gibt man 200 *g* $Na\,NO_2$ in 1000 *cm*³ Wasser und fügt allmählich zu dem Gesamtgemisch 140 *g* Eisessig. Es tritt lebhafte Gasentwicklung auf! Nach zwölf Stunden Stehen erwärmt man noch zwei Stunden am Wasserbad, bis die Gasentwicklung beendet ist. Die klare Flüssigkeit wird vorsichtig mit 1 *kg* gepulvertem Ammonsulfat versetzt (starkes Schäumen, daher Vorsicht!), wobei sich ein gelbes Harz abscheidet. Die halbfeste Masse wird auf einem Leinwandfilter gesammelt, oberflächlich gewaschen und in 400 *cm*³ Wasser gelöst. Aus dieser Lösung fällt man durch Aussalzen mit 200 *g* $Am_2\,SO_4$ in Substanz. Das Lösen in Wasser und Fällen mit Ammonsalz wird viermal wiederholt. Die letzte Fällung wird abfiltriert, in 400 *cm*³ Wasser gelöst, mit Barytwasser von der Schwefelsäure, mit CO_2 vom überschüssigen Baryt des Bariumsulfatfiltrates befreit. Das so gewonnene Filtrat des Bariumkarbonates wird im Vakuum bei gelinder Wärme eingedunstet. Zuletzt versetzt man die heiße Lösung mit dem doppelten Volumen Alkohol. Eine beim schnellen Abkühlen der heißen Lösung entstehende harzige Fällung wird durch plötzliches Erhitzen und langsames Abkühlen in Lösung gebracht. Das Filtrat dunstet man zu Sirup ein und trocknet diesen im Vakuum zu einer pulverisierbaren Masse.

Für Globulin verwendet man auf 20 *g* Serumglobulin 600 *cm*³ Wasser, 20 *cm*³ Eisessig und 16 *g* $Na\,NO_2$, in 200 *cm*³ Wasser gelöst. Man verfährt in der für das Desaminokasein beschriebenen Weise. Das Desaminoglobulin fällt aus der Lösung aus. Es wird

durch sehr energisches Waschen, Anreiben und Auskochen mit Wasser von Nitrosoverbindungen gereinigt.

A. Kossel und *F. Weiss*[1]) haben aus Sturin ein „Desamidosturin“ dargestellt.

3. Nitroproteine.

v. Fürth[2]) hat eine als Xanthoproteinsäure bezeichnete Substanz genauer studiert, die bei der Einwirkung von Salpetersäure auf Kasein entsteht. Die Substanz zeigt keine Millon- und keine Schwefelbleireaktion mehr.

Darstellung nach *v. Fürth.* Man trägt fein gepulvertes, entfettetes Kasein vorsichtig und portionenweise in das doppelte Gewicht einer reinen, konzentrierten Salpetersäure ein. Die Säure enthält zur Bindung etwa entstehender salpetriger Säure einige Gramm Harnstoff. Jede Erwärmung ist bei dieser Nitrierung zu vermeiden. Man gewinnt so eine klare, gelbliche Lösung, die man unter guter Kühlung in einem feinen Strahl in das mehrfache Volumen gut gekühlten Wassers fließen läßt. Es entsteht ein hellgelber Niederschlag, den man auf dem Filter sammelt und gut mit Wasser auswäscht. Hierauf löst man den Körper in Natronlauge, in der er sich mit rotbrauner Farbe löst, und fällt ihn durch Zusatz von Essigsäure. Dieses Lösen und Fällen wird mehrfach wiederholt; zuletzt befreit man durch Dialyse von Salzbeimischungen und trocknet nach Vorbehandlung mit Alkohol und Äther.

A. Kossel, F. Weiss[3]) und *E. L. Kennaway*[3]) haben Klupein, Salmin, Sturin, Histon und Edestin nitriert. Die Methode für Klupein sei hier wiedergegeben.

2 *g* Klupeinsulfat werden mit 4 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und 2 cm^3 rauchender Schwefelsäure (10% SO_3) unter Eiskühlung zur gleichförmigen dicklichen Masse verrührt. Man fügt nun 1 cm^3 rauchende Salpetersäure, welche ebenfalls abgekühlt ist, hinzu und mischt unter stetigem Abkühlen durch. Nach fünf bis zehn Minuten läßt man die Masse in etwa 200 cm^3 eisgekühltes Wasser tropfen. Das Nitroklupein scheidet sich als rein weißer Niederschlag aus. Während dieser Operation darf sich weder Erwärmung noch Gasentwicklung einstellen, auch soll das Präparat keine gelbe oder braune Farbe haben. Der Niederschlag ist nach einigem Stehen zerreiblich; er wird dann mit Wasser ausgewaschen und durch Umfällung aus Natronlauge mit Schwefelsäure gereinigt. Die Substanz zeigt die Biuretreaktion und gab bei der

[1]) *A. Kossel* und *F. Weiss*: Über das Sturin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **78**. 407 (1912).

[2]) *B. v. Fürth*: Einwirkungen von Salpetersäure auf Eiweißstoffe. Habil.-Schrift. Straßburg 1899.

[3]) *A. Kossel* und *E. L. Kennaway*: Über Nitroklupein. Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**. 486 (1911).

Hydrolyse Nitroaozinin. *K. Inouye*[1]) hat Seidenfibroin nitriert; aus dem Nitroprodukt gelang die Darstellung von Mononitrotyrosin, das also hier eine ähnliche Rolle spielt, wie das Dijodtyrosin bei den Jodproteinen.

30 bis 50 *g* Seidenabfälle werden in einer Stutze mit verdünnter Salpetersäure (ohne Harnstoffzusatz, da dieser nach *Inouye* die Zahl der eintretenden Nitrogruppen vermindert!) von 20% überschichtet, gut durchgerührt und 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die intensiv gelb gefärbte „Nitroseide" wird von der Salpetersäure getrennt, gründlich mit Wasser gewaschen und nach Behandlung mit Alkohol und Äther getrocknet[2]).

4. Geschwefelte Proteine.

Ein schwefelreiches Produkt wurde von *Treves* und *Pelliza*[3]) durch Einwirken von CS_2 auf Ovalbumin bei 50° erhalten. Einheitlichkeit der Substanz und Bindung des Schwefels sind unsicher. Aus ihrem Schwefelprotein haben *Treves* und *Pelliza* (l. c.) auch ein diazotiertes Produkt hergestellt, indem sie die Substanz in essigsaurer Lösung mit $NaNO_2$ behandelten. *R. Uhl*[4]) hat Metallverbindungen geschwefelter Proteine dargestellt; so erhielt er aus Kasein ein Schwefelkaseinkupfer mit 17·91% Cu in folgender Weise: 5 *g* Kasein werden in 100 *cm*³ 5%iger Natronlauge gelöst, filtriert und mit 2 *cm*³ Schwefelkohlenstoff versetzt. Die Mischung bleibt in verschlossener Flasche einige Tage unter häufigem Umschütteln stehen. Arbeitet man unter Erhitzen am Rückflußkühler, so ist die unter reichlicher Gasbildung verlaufende Reaktion schon in wenigen Stunden beendet. Sodann wird der überschüssige Schwefelkohlenstoff abdestilliert und das Produkt nach dem Erkalten entweder mit einem Gemisch von Azeton und Alkohol (1:1) gefällt oder durch Zusatz von ammoniakalischer Kupferazetatlösung (4 *g*) die Kupferverbindung bereitet, die aus der braunen Lösung mittels Azeton ausfällt.

5. Oxyproteine (Peroxyprotsäuren, Desaminoprotsäuren, Kyroprotsäuren).

Durch Oxydation von genuinen Eiweißkörpern entstehen als Produkte einer energischen Spaltung und gleichzeitigen Oxydation neben Albumosen, Peptonen und organischen Säuren einige

---

[1]) *K. Inouye*: Über die Xanthoproteinreaktion. Idid. **81**. 80 (1912).

[2]) Über die Struktur des Nitrotyrosins, vgl. *Treat B. Johnson* und *Edw. F. Kohmann*: Studien über nitrierte Proteine I. Journ. Amer. Chem. Soc. **37**. 1863 (1915); ibid. 2164; ibid. 2170.

[3]) *Treves* und *Pelliza*: Accad. reale delle scienze di Torino. **39**. (1904).

[4]) *R. Uhl*: Über lösliche Metallverbindungen geschwefelter Eiweißkörper. Jahrb. f. physiol. Chem. **84**. 478 (1913).

Substanzen, welche noch die Biuretreaktion geben; wegen ihrer sauren Eigenschaften und der Art ihrer Entstehung werden sie als Oxyprotsäuren bezw. Peroxyprotsäuren bezeichnet.

Für die Methoden ihrer Darstellung sind heute die Angaben von *v. Fürth*[1]) maßgebend.

Darstellung: 0·5 *g* gut entfettetes Kasein wird in einem großen Standgefäß mit 8 *l* Wasser und 0·5 *l* Natronlauge (*s* = 1 : 3) übergossen. Unter Umrühren wird im Laufe einiger Wochen feingepulvertes Kaliumpermanganat portionenweise dieser Mischung zugefügt. Im ganzen werden 2 *kg* verbraucht. Das Reaktionsgemisch, das in der Zwischenzeit gallertig wird, wird zuletzt flüssig. Durch energisches Abzentrifugieren von ausgeschiedenem Braunstein gewinnt man eine klare, gelbe Flüssigkeit. Die Braunsteinpräzipitate werden mit kaltem Wasser gut aufgerührt und ausgewaschen; die vereinigten Flüssigkeiten werden filtriert und nach Abstumpfen der Lösung mit Eisessig zu schwach alkalischer Lösung mit überschüssigem Bleiessig gefällt. Der massenhafte weiße Niederschlag (Bleiniederschlag I) wird durch Dekantieren von dem größeren Teil der überstehenden Flüssigkeit getrennt, dann auf Büchnerfiltern gesammelt und in der Presse scharf abgepreßt.

Den Bleiniederschlag I suspendiert man in Wasser und entbleit ihn in der Wärme mit Schwefelwasserstoff. Durch Filtration trennt man vom Bleisulfid. Dieses selbst wird durch energisches Waschen mit heißem Wasser (sechs- bis 13maliges Aufschwemmen und erneutes Sättigen mit H_2S) von den letzten Spuren ihm anhaftender Peroxyprotsäure befreit. Aus den vereinigten Filtraten und Waschflüssigkeiten fällt man die Oxalsäure mit Ätzbaryt. Die Filtrate des oxalsauren Bariums werden mit CO_2 von überschüssigem Baryt befreit, die Filtrate des Bariumkarbonates schließlich mit einem Überschuß von Silbernitrat gefällt. Den Silberniederschlag sammelt man auf einem Filter, wäscht ihn gut aus, suspendiert ihn dann in Wasser und befreit ihn vom Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff. Das Filtrat des Schwefelsilbers wird dann im Vakuum bei 50° eingeengt und zuletzt im Vakuum über Schwefelsäure eingetrocknet (= Peroxyprotsäure A). Das Filtrat des Silbernitratniederschlages wird gleichfalls mit Schwefelwasserstoff entsilbert, durch einen Luftstrom von H_2S befreit und mit einer Lösung von Quecksilberazetat versetzt. Den mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag suspendiert man in Wasser und zersetzt ihn mit H_2S. Das Filtrat des Quecksilbersulfides enthält die Peroxyprotsäure B.

Das Filtrat der oben als Bleiniederschlag I bezeichneten Fällung wird mit Quecksilberazetat gefällt (Quecksilberniederschlag II.) Der entstehende Niederschlag wird wie die Fällung der vorgenannten

[1]) *O. v. Fürth*: Beiträge zur Kenntnis des oxydativen Abbaues der Eiweißkörper. *Hofmeisters* Beitr. 6. 296 (1905).

Peroxyprotsäure B behandelt. Das Filtrat des Hg S und Pb S enthält die Peroxyprotsäure C. Aus dieser wässerigen Lösung fällt man die Säure wiederum mit Quecksilberazetat im Überschuß. Den voluminösen Niederschlag wäscht man auf dem Filter gut mit Wasser aus. Dann verteilt man ihn in Wasser und bringt ihn durch Zusatz von Salpetersäure zum größten Teil in Lösung. Die klar filtrierte Lösung versetzt man durch Zusatz von Natronlauge bis zum Neutralpunkt und gewinnt eine gelatinöse Fällung des Quecksilbersalzes der Peroxyprotsäure C. Den Niederschlag bringt man auf ein Filter, behandelt ihn mit Alkohol und Äther, so daß eine pulverisierbare Masse entsteht. Diese wäscht man nach kurzem Trocknen mit Wasser gründlich salzfrei, dann entwässert man mit Alkohol, zuletzt mit Äther und trocknet über Schwefelsäure im Vakuum.

Um das Verfahren dieser zahlreichen, zeitraubenden Fällungen abzukürzen, kann man auch so verfahren:

Das als Bleiniederschlag I bezeichnete Gemisch der Säure A und B wird in trockenem Zustande mit alkoholischer Salzsäure (10 Teile absoluter Alkohol + 1 Teil mit gasförmiger Salzsäure gesättigter Alkohol) zwei Stunden lang am Rückflußkühler gekocht.

Die klare gelbe Lösung der Peroxyprotsäureester wird im Vakuum bei 30 bis 40 *mm* Druck von Alkohol befreit. Der sirupöse Rückstand wird in Wasser übertragen und durch energisches Durchrühren und Durchkneten mit häufig gewechselten Portionen Wasser in eine teigige Masse verwandelt. Den äußerlich getrockneten Rückstand löst man in Chloroform. Die Chloroformlösung wird durch wasserfreies Kupfersulfat entwässert und mit dem fünffachen Volumen wasserfreien Äthers gefällt. Durch häufiges Wechseln des Äthers erhärtet die erste teigige Fällung und läßt sich nach Beseitigen des Äthers und Trocknen im Vakuum über Paraffin und Schwefelsäure in ein zerreibliches Pulver verwandeln.

Ausbeute: 34 *g* aus 2 *kg* feuchtem Bleiniederschlag I.

Dieses Estergemenge verseift man durch ein- bis zweistündiges Kochen mit starkem Ammoniak. Die Lösung der Säuren wird filtriert, mit Tierkohle entfärbt und eingedunstet. Den Rückstand löst man in Wasser und befreit ihn nach dem Ansäuern mit Salpetersäure durch vorsichtigen Zusatz von $Ag\ NO_3$ von Chloriden.

Das Filtrat des Chlorsilbers wird vorsichtig neutralisiert. Durch erneuten Zusatz von Silbernitrat fällt man das Silbersalz der Säure A. Aus der Silberfällung kann man die freie Säure in der oben beschriebenen Art isolieren. Zu Analysenzwecken reinigt man das Silbersalz selbst, indem man die Fällung auf dem Filter gut auswäscht und mehrfach aus seiner Lösung in verdünnter Salpetersäure durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak fällt. Jede Fällung wird jedesmal auf einem gehärteten Filter gesammelt, gewaschen

45*

und vor der erneuten Lösung in verdünnter Salpetersäure mit Wasser gut angerieben.

Der zuletzt gewonnene Niederschlag wird durch Verweilen unter absolutem Alkohol gehärtet und entwässert. Nach dem Verdrängen des Alkohols durch Äther wird das staubfein zerriebene Produkt mit viel Wasser salzfrei gewaschen, auf dem Saugfilter gesammelt und in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther nachbehandelt. Schließlich wird im Vakuum getrocknet.

Die Peroxyprotsäuren werden durch Barytspaltung in Desaminoprotsäuren, Oxalsäure und basische Komponenten zerlegt.

Im Prinzip gestaltet sich die Darstellung der Desaminoprotsäuren folgendermaßen: Das Silbersalz der Peroxyprotsäure A + B wird drei Stunden lang mit Ätzbaryt gekocht (20 *g* Silbersalz + 15 *g* $Ba(OH)_2$). Von dem ausgeschiedenen Silberoxyd und Bariumoxalat wird durch Filtration getrennt. Das alkalisch reagierende Filtrat wird mit einem Überschuß von Quecksilberazetat gefällt. Der voluminöse Niederschlag wird auf einem Saugfilter durch häufiges Verreiben mit Wasser barytfrei gewaschen und dann, in Wasser suspendiert, durch H_2S zersetzt. Das von H_2S befreite Filtrat des Hg S wird abermals mit Barytwasser sechs Stunden lang gekocht. Die filtrierte Lösung wird von überschüssigem Baryt mit CO_2 befreit, etwas eingeengt und dann filtriert und abermals mit Quecksilberazetat gefällt. Das entstehende Quecksilbersalz der Deaminoprotsäure wird weiter wie das Hg-Salz der Peroxyprotsäure C (siehe oben) gereinigt. Ausbeute: 1·2 *g* Hg-Salze aus 20 *g* peroxyprotsaurem Silber A, 9·4 *g* Hg-Salz aus peroxyprotsaurem Quecksilber C.

Während die Peroxyprotsäuren einer weiteren Oxydation widerstehen, lassen sich die Desaminoprotsäuren zu Kyroprotsäuren weiter oxydieren.

Darstellung von Kyroprotsäuren. Man geht nicht von den isolierten Desaminoprotsäuren, sondern von den Peroxyprotsäuren selbst aus.

Man löst das Rohprodukt von Peroxyprotsäure A + B (gewonnen aus dem oben genannten „Bleiniederschlag I" durch Entbleien und Eintrocknen der Filtrate) in Wasser und kocht zwei Stunden lang mit der gleichen Menge Barythydrat. Hierauf fügt man zu der in Eis gekühlten Lösung portionenweise Kalziumpermanganat (auf 200 *g* Säure kommen 200 *g* Barythydrat und 110 *g* Permanganat). Nach eingetretener Entfärbung filtriert man und fällt das oxalsaure und barytfreie, alkalisch reagierende Filtrat mit Quecksilberazetat (Kyroprotsäure A + B). Die Fällung wäscht man auf dem Saugfilter gut mit Wasser aus, zersetzt sie dann mit H_2S und fällt aus dem von H_2S befreiten Filtrat die Kyroprot-

säure B durch einen Überschuß von neutralem Bleiazetat. Aus dem Filtrat dieses Niederschlages fällt man die Kyroprotsäure A wiederum durch Quecksilberazetat.

Beide Niederschläge behandelt man weiter in der wiederholt beschriebenen Weise durch energisches Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther und Trocknen bei 95° [1]).

ANHANG.

1. *C. Harries* und *K. Langheld*[2]) haben Kasein in alkalischer Lösung ozonisiert. 200 *g* Kasein wurden unter Zusatz von 475 cm^3 n-Natronlauge in 3·5 *l* Wasser gelöst und in die trübe Lösung Ozon eingeleitet. Die Lösung färbt sich zunächst unter Nebelbildung dunkelbraun, wird aber nach 30stündiger Einwirkung bei Aufhören der Dämpfe wieder wasserklar. Nach zirka zehnstündiger Oxydation ist die alkalische Reaktion aufgehoben. Die Lösung rötet blaues Lackmuspapier und schäumt stark. Die Gesamteinleitungsdauer ist 110 Stunden. Durch Abscheidung von Keto- oder Aldehydgruppen mittels Phenylhydrazin, durch Fällung mit Bleiazetat und fraktionierte Fällung der aus dem Bleiniederschlag regenerierten Substanz mit Alkohol und durch kombinierte Behandlung mit Phosphorwolframsäure und Bleiazetat konnten einheitliche Produkte nicht erhalten werden.

2. Durch Fällen einer wässerigen Serumalbumin- oder Ovalbuminlösung mit 10%iger glasiger Phosphorsäure und sofortiges Verdünnen mit Wasser hat *Fuld*[3]) eine in Wasser unlösliche, in verdünntem Alkali lösliche Verbindung hergestellt und zum Zweck der Molekulargewichtsberechnung analysiert. Ihr Phosphorgehalt beträgt 3·33% im Durchschnitt.

H. Bechhold[4]) hat versucht, „Phosphorsäureester" des Ovalbumins darzustellen. Eine mit etwas Natronlauge versetzte Ovalbuminlösung wird mit tropfenweise zugegebenem $PO\,Cl_3$ geschüttelt, nach Ausscheidung eines Koagulums dieses wieder durch Zusatz von Natronlauge gelöst und das so lange wiederholt, bis eine dem Gewicht des Proteins etwa gleiche Menge $PO\,Cl_3$ verbraucht ist. Die Lösung wird dann angesäuert und der Niederschlag abfiltriert. Sowohl im Filtratkoagulum wie im Niederschlag findet sich Phosphor in fester Bindung. Verwendet man statt Natronlauge basisches Natriumphosphat, so entstehen andersgeartete Produkte.

---

[1]) Hiezu vgl. ferner: Über Oxyprotsulfonsäure. *J. Buraczewski* und *L. Krauze*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**. 153 (1911); Über Desaminokyroprotsäure. *Eisler*: Biochem. Zeitschr. **51**. 26 (1913).

[2]) *C. Harries* und *K. Langheld*: Über das Verhalten des Kaseins gegen Ozon. Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**. 342 (1907).

[3]) *Fuld*: Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **2**. 155 (1902).

[4]) *H. Bechhold*: Über Phosphorsäureester von Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**. 122 (1901).



II. Proteine mit organischen Komponenten.

1. Methylenproteine (Aldehydproteine).

Methylenproteine sind Verbindungen der Proteine mit Aldehyden, insbesondere Formaldehyd, deren Lösungen sich durch das Fehlen der Hitzegerinnbarkeit auszeichnen. Diese Körperklasse ist zuerst von *F. Blum*[1]) beschrieben und dann von *L. Schwarz*[2]) weiter untersucht worden. Die Aldehydproteine können nach Fällung mit Alkohol in frischem Zustand wieder in Wasser gelöst werden. Die Darstellungsweise der Methylenproteine ist folgende: Man läßt eine Lösung eines gereinigten Eiweiß, zu der man wenige Tropfen einer 40%igen Formaldehydlösung oder irgendeines anderen Aldehydes zugesetzt hat, geraume Zeit stehen und fährt dann mit dem Aldehydzusatz so lange fort, bis die Lösung nach einiger Zeit ihren Aldehydgeruch beibehält. Dann läßt man zwei Monate stehen, fügt unter Umständen der Aldehydeiweißlösung noch einen kleinen Aldehydüberschuß zu und fällt nach der genannten Zeit das in Lösung befindliche, inkoagulable Aldehydeiweiß durch ein Gemisch gleicher Mengen Alkohol und Äther. Zur Analyse werden die Fällungen mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet. Erhitzen ist zu vermeiden, da sonst der Aldehyd wieder abgespalten wird.

Die Zusammensetzung dieser Substanzen hängt von der Dauer bezw. der Menge des zur Addition disponiblen Aldehydes ab.

Schwarz hat Formaldehyd, Azetaldehyd und Benzaldehyd auf Serumalbumin, Serumglobulin, Ovalbumin, Edestin, Heoteralbumose und Jodovalbumin (nach *Hofmeister* jodiert) einwirken lassen; die Heteroalbumose nimmt mehr Formaldehyd auf als die genuinen Proteine, das Jodovalbumin gar keines.

Durch Behandlung des Methylenovalbumins mit Na NO- und Salzsäure bei 0° haben *Treves* und *Pelliza* (l. c.) ein Diazoformaldehydalbumin durch zwölfstündige Behandlung mit CS_2 ein geschwefeltes Methylenalbumin erhalten, das sich wiederum diazotieren läßt. Diese Substanzen sind noch nicht weiter untersucht.

Die Fähigkeit freier Aminogruppen, Formol zu binden, hat weiterhin in den Händen von *Soerensen* zu der Methode der Formoltitration geführt (s. d.).

---

[1]) *F. Blum*: Über eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 127 (1896); Anat. Anzeiger **11**. Nr. 23 und 24 (1896).

[2]) *L. Schwarz*: Über Aldehydeiweiße. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**. 460 (1900).



Nach Untersuchungen von *K. Landsteiner* und *H. Lampl*[1]) wird die Artspezifität von Serumalbumin durch Methylenierung nicht oder nur wenig verändert.

2. Methylproteine.

Methylierte Proteine hat zuerst *Skraup*[2]) hergestellt. Er ließ Jodmethyl und alkoholische Kalilauge auf Kasein und Glutin einwirken und erhielt Methylkasein bezw. Methylglutin, die aber noch Jod enthielten.

Herzig und *Landsteiner*[3]) haben Diazomethan als Methylierungsmittel angewandt. Als Beispiel diene folgende Angabe von *K. Landsteiner*[4]):

100 cm^3 Pferdeserum werden mit Alkohol gefällt, mit absolutem Alkohol und trockenem Äther gewaschen und ätherfeucht in eine aus 40 cm^3 Nitrosomethylurethan hergestellte Lösung von Diazomethan eingetragen, gut verteilt und zur Entfernung größerer Partikel durch Gaze filtriert. Nach 10- bis 14tägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird abfiltriert und die Substanz auf dem Filter oder der Zentrifuge mit Alkohol und Wasser gewaschen. (Dieses Präparat diente zur Untersuchung auf Antigeneigenschaften.) Die Herstellung des Diazomethans (Vorsicht wegen der Giftigkeit, Vorlegen mehrerer Waschfläschen mit Äther zum Auffangen etwa entweichenden Gases!) geschieht in einer Lösung von 10 cm^3 Nitrosomethylurethan in 60 bis 70 cm^3 trockenem Äther durch Hinzufügen von 10 cm^3 25%iger methylalkoholischer Kalilauge. *Herzig* und *Landsteiner* (l. c.) sprechen gegenüber den hiebei eintretenden Methylgruppen von einer „Ätherzahl". Kocht man Proteine zehn Stunden lang mit 1%iger methylalkoholischer Salzsäure, so werden gleichfalls methylierte — offenbar tiefer abgebaute — Produkte erhalten, deren Methylzahl als „Esterzahl" bezeichnet wird.

S. Edlbacher[5]) hat Proteine mit Dimethylsulfat methyliert und hiemit Versuche von *Rogozinski*[6]) fortgesetzt. Nach *Edlbacher*

---

[1]) *K. Landsteiner* und *H. Lampl*: Über die Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweißantigen. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. **26**. I. 133 (1917).

[2]) *Zd. Skraup* und *Krause*: Monatsh. f. Chem. **30**. 447 (1909); *Zd. Skraup* und *Boettcher*: ibid. **31**. 1035 (1910).

[3]) *J. Herzig* und *K. Landsteiner*: Biochem. Zeitschr. **61**. 458 (1914); **67**. 334; Über die Methylierung der Eiweißstoffe. Monatsh. f. Chem. **39**. 269 (1918).

[4]) *K. Landsteiner*: Über die Antigeneigenschaften von methyliertem Eiweiß. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. **26**. I. 122 (1917).

[5]) *S. Edlbacher*: Über die freien Amidogruppen der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**. 52 (1919).

[6]) *F. Rogozinski*: Zur Methylierung des Klupeins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 371 (1912).

verfährt man in folgender Weise: Die wässerige Lösung des Proteins wird mit der mehrfachen Menge Dimethylsulfat und Natriumhydroxyd unter kräftiger Wasserkühlung geschüttelt, so daß während der ganzen Reaktionsdauer die Temperatur 15° nicht übersteigt. So kommen auf 2·5 *g* Gelatine, in 100 cm^3 Wasser gelöst, 6 *g* Natriumhydroxyd und 15 *g* Dimethylsulfat; schon nach einer viertel Stunde ist alles Dimethylsulfat verschwunden. Das Reaktionsgemisch wird noch zehn Minuten stehen gelassen und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Von dieser Lösung werden bekannte Teile (10 cm^3) zur Gesamtstickstoff- und Methylbestimmung entnommen. Unter der „N-Methylzahl" versteht *Edlbacher* „diejenige Zahl, welche angibt, wieviel Methylgruppen auf je 100 Atome Stickstoff bei erschöpfender Behandlung mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung an Stickstoff gebunden werden". Eine Isolierung der Methylprodukte ist hier unnötig; die Ergebnisse können mit derjenigen der Formoltitration und des *van Slyke*-Stickstoffes unmittelbar verglichen werden. Über die Technik der Methylbestimmung vgl. dieses Handbuch[1]).

3. Azetylproteine und Azylproteine.

1. *K. Landsteiner* und *E. Prásek*[2]) haben zwecks Gewinnung einer „A z e t y l z a h l" Proteine azetyliert. Essigsäureanhydrid wird zirka drei Stunden lang bei Wasserbadtemperatur auf das Protein einwirken gelassen; die Menge des Essigsäureanhydrides soll nicht zu groß sein. Nach der angegebenen Zeit ist die Grenze der Azetylaufnahme erreicht. Zwar steigt die Azetylzahl noch innerhalb von 12 bis 14 Stunden an, jedoch zeigt das Produkt hiebei bereits Zersetzung. Die Millonreaktion der Azetylproteine ist beeinträchtigt. Die Bestimmung des Azetyls geschieht nach der Methode von *F. Wenzel*[3]).

2. *K. Hirayama*[4]) hat Säurechloride auf Protamine einwirken lassen und so β-Naphthalinsulfoklupein, Benzolsulfoklupein und Benzolsulfosturin dargestellt. Die Ergebnisse sind nicht völlig einheitlich.

---

[1]) Makrobestimmung der Methyl- und Methylimidgruppen. Abt. I, 3. Von *Prof. Dr. Herzig.*

[2]) *K. Landsteiner* und *E. Prásek*: Über azetylierte Eiweißkörper. Biochem. Zeitschr. **74**. 388 (1916); ibid. **58**. 362 (1914).

[3]) *F. Wenzel*: Über eine allgemein anwendbare Methode der Bestimmung von Azetylgruppen. Monatsh. f. Chem. **18**. 659 (1897). Vgl. auch dieses Handbuch: Qualitative und quantitative Bestimmungen der Azetylgruppen. Abt. I, 3. Von *Prof. Dr. Simonis.*

[4]) *K. Hirayama*: Über die Einwirkung einiger Säurechloride auf Protamine. Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**. 285 (1909).

Als Beispiel der Methode diene die Darstellung des β-Naphthalinsulfoklupeins.

1 *g* Klupeinsulfat wird in 15 cm^3 Normalkalilauge gelöst, eine Stunde im Schüttelapparat geschüttelt, wobei die Reaktion stark alkalisch bleibt. Nach kurzer Zeit beginnt die Ausscheidung einer teigigen Masse. Diese wird mit Wasser und Äther in etwa 20mal erneuerten Portionen in der Reibschale durchknetet und dann im Vakuumexsikkator zur Analyse getrocknet. Aus dem Fehlen der Diazoreaktionen beim Benzolsulfosturin ist zu schließen, daß einer der Säurereste in den Imidazolring des Histidins eingetreten ist[1]).

3. Benzoylprodukte der Proteine herzustellen versuchte zuerst *H. Schroetter*[2]) am *Witte*-Peptongemisch; er kam jedoch nicht zu einheitlichen Resultaten. Dagegen gelingt es nach *F. Blum* und *Th. Umbach*[3]), gut charakterisierte Benzoylderivate von Serumalbumin, Serumglobulin und Jodserumalbumin zu erhalten.

Bei der Benzoylierung in Lauge ergeben sich keine konstant zusammengesetzten Produkte; solche aber werden aus bikarbonatalkalischer Lösung in folgender Weise gewonnen: Das Protein wird in wässeriger, ausdialysierter Lösung mit Bikarbonat versetzt (Menge beliebig) und unter fortwährendem Schütteln und Abkühlen tropfenweise Benzoylchlorid zugesetzt. Schon nach kurzer Einwirkung setzen sich fast weiße Körner zu Boden, die meist die Form von Kugeln oder Kugelbruchstücken aufweisen. Der Benzoylgeruch verschwindet langsam; die Reaktion bleibe stets alkalisch. Die Beendigung der Reaktion zeigt eine Probe auf Eiweiß im Filtrat an. Das ausgeschiedene, in allen Lösungsmitteln, selbst in starken Laugen, unlösliche Benzoylprodukt von kristallinischer Beschaffenheit wird auf Seide abfiltriert und mit bikarbonathaltigem Wasser so lange behandelt, bis im Waschwasser weder mit $AgNO_3$ noch mit $BaCl_2$ eine Trübung auftritt. Sodann behandelt man mit verdünnter Schwefelsäure oder Essigsäure und kocht schließlich zur restlosen Entfernung anhaftender Benzoesäure mehrfach mit Alkohol aus. Die aus absolutem Alkohol und Äther getrockneten Substanzen geben fast alle Proteinreaktionen nicht mehr, die Millonreaktion bleibt zweifelhaft. Die „Benzoylzahl" wird durch Abspaltung und Titration der Benzoesäure bestimmt. Nach *Blum* und *Umbach* ergibt sich eine Differenz im Kohlenstoffgehalt der Benzoylverbindungen des Serumglobulins von Pferd und Rind; die Ben-

[1]) Hierzu ferner: *S. Edlbacher* und *B. Fuchs*. Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, 133 (1921).

[2]) *H. Schroetter*: Über Äther der Eiweißkörper. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **22**. 1950 (1889).

[3]) *F. Blum* und *Th. Umbach*: Über Benzoylverbindungen von Eiweißkörpern. Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**. 285 (1913).

zoylierung weist hier — im Gegensatz zur Jodierung — auf Unterschiede im gleichen Protein verschiedener Tierspezies hin.

Blum und *Umbach* haben auch Jodserumalbumin nach der angegebenen Methode benzoyliert; ferner haben sie Chlorkohlensäureester und Benzoylsulfochlorid auf Serumglobulin (Rind) einwirken lassen. Auch hiebei verläuft die Reaktion in bikarbonatalkalischer Lösung; das Produkt aus Chlorkohlensäureester fällt in Flocken aus und wird erst beim Auskochen mit Alkohol pulverförmig. Die Benzolsulfoverbindung ist ein amorpher unlöslicher Körper.

Methoden zur Enteiweißung von eiweißhaltigen Flüssigkeiten.

Von **P. Rona**, ergänzt von **Eduard Strauss**.

Die Enteiweißung eiweißhaltiger Flüssigkeiten ist bei physiologischen Arbeiten eine der häufigst ausgeführten Manipulationen. Die Abscheidung von Eiweiß wird natürlich immer dann vorgenommen werden, wenn man über die Menge und Natur der in den zu untersuchenden Flüssigkeiten gelösten Eiweißkörper Aufschluß erhalten will. Sehr wichtig ist ferner eine vollständige Abscheidung der Eiweißkörper dann, wenn man auf eventuelle, den Eiweißkörpern näher oder ferner stehende Eiweißderivate in der Flüssigkeit fahndet. Da diese Eiweißabkömmlinge die allgemeinen Eiweißreaktionen noch mehr oder weniger geben, andrerseits ihre Isolierung oft wegen der geringen Mengen, in denen sie im besten Falle in den Körperflüssigkeiten vorkommen, nicht möglich ist, so ist man vielfach darauf angewiesen, ihre Gegenwart aus allgemeinen Reaktionen, die auch die Eiweißkörper geben, zu erschließen. Der positive Ausfall der Reaktion ist daher nur bei sicherer Abwesenheit der Eiweißkörper verwertbar. Eine vollständige Entfernung von Eiweiß aus einer Lösung ist schließlich dann erforderlich, wenn die Gegenwart der Eiweißsubstanzen gewisse Reaktionen stört, die zur Bestimmung anderer Substanzen, wie z. B. Zucker, ausgeführt werden müssen.

Zur Entfernung der Eiweißkörper aus einer Lösung können natürlich sämtliche Methoden angewendet werden, die zu ihrer Abscheidung führen. Je nachdem man jedoch mit der Enteiweißung bestimmte Ziele verfolgt, ergibt sich eine große Mannigfaltigkeit der Verfahren. Da durch die verschiedenen Methoden meist neben der Ausscheidung von Eiweiß noch andere Körper mitgefällt werden, außerdem die Flüssigkeit in ihrer Zusammensetzung, Reaktion usw. eine Veränderung erleidet, die dem gewünschten Zweck förderlich oder hinderlich sein kann, muß von Fall zu Fall geprüft werden, welche Methode gerade am besten entspricht. Es wäre kaum durchführbar, alle überhaupt möglichen Wege zur Enteiweißung anzuführen; im folgenden sei nur versucht, außer einigen allgemeinen Gesichtspunkten die am häufigsten angewandten zu erwähnen.

Die allgemeinste Verwendung findet die Koagulation der Eiweißkörper in der Siedehitze[1]). Dabei muß man auf schwach saure Reaktion und Anwesenheit von Salzen (falls solche nicht in genügender Menge in der Flüssigkeit vorhanden sind) achten. Die Reaktion darf nur schwach sauer sein; bei dem geringsten Überschuß von Säure bildet sich lösliches Acidalbumin, und die Abscheidung des Eiweißes wird unvollständig. Gegenwart von Salzen befördert die Fällung, da das denaturierte Eiweiß durch das Elektrolyt gefällt wird[2]). Man arbeitet daher nach *Cohnheim*[3]) am besten so, daß man zu der zu koagulierenden Flüssigkeit Chlornatrium oder ein anderes Neutralsalz zusetzt; dann kann ruhig ein Überschuß von Essigsäure zugesetzt werden. Die Gefahr einer tiefgehenden Veränderung der Eiweißkörper während des kurzen Kochens in der schwach sauren Lösung soll nicht vorhanden sein. So gut verwendbar die Methode zur Enteiweißung von Organflüssigkeiten, eiweißhaltigem Harn und ähnlichem ist, so versagt sie bei der Enteiweißung des Blutes sehr oft. Man verfährt dabei so, daß man das mit 2- bis 5%iger Kochsalzlösung zehn- bis zwölffach verdünnte Blut bei schwach essigsaurer Reaktion unter lebhaftem Umrühren aufkocht, oder man gießt das Blut in dünnem Strahl in die entsprechende Menge siedende, schwach essigsaure Kochsalzlösung. Da die Eiweißkörper einen Teil der Säure binden, muß durch weiteres Hinzufügen von Essigsäure die schwach saure Reaktion aufrecht erhalten werden. Sehr große Mengen der eiweißhaltigen Flüssigkeit können in kürzester Zeit aufgekocht werden, wenn mittels eines Bleirohres überhitzter Wasserdampf durch die Flüssigkeit geleitet wird.

Von den Fällungsmitteln, die bei der Entfernung des Eiweißes angewendet werden, ist zunächst der Alkohol zu nennen. So hat, um ein Beispiel anzuführen, *J. G. Otto*[4]) das direkt aus der Ader kommende Blut, um es für die nachträgliche Zuckerbestimmung vorzubereiten, in einem großen Überschuß von absolutem Alkohol aufgefangen. Die Eiweißkörper werden dabei nicht sofort denaturiert, sondern behalten einige Zeit ihre Löslichkeit im Wasser. *S. B. Schryver*[5]) kocht das vorher mit dem gleichen Gewicht wasserfreien Natriumsulfates getrocknete Serum eine

[1]) Vgl. dazu dieses Handbuch, S. 462, wo allgemeine Angaben über die Mittel zur Fällung von Proteinen aus ihren Lösungen (Koagulation, Aussalzen, Alkaloidreagenzienfällung) gemacht sind.

[2]) Vgl. hierzu *O. Cohnheim*: Chemie der Eiweißkörper. 2. Aufl. S. 130 (1904); *P. Rona*: Allgemeine Chemie der Eiweißkörper im Handbuch der Biochemie von *C. Oppenheimer*. **1**. 244 (1908).

[3]) *O. Cohnheim*: Die Umwandlung des Eiweißes durch die Darmwand. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 451 (1901).

[4]) *Jac. G. Otto*: Über den Gehalt des Blutes an Zucker und reduzierenden Substanzen unter verschiedenen Umständen. *Pflügers* Arch. **34**. 393 (1885).

[5]) *C. B. Schryver*: Studies in the chemical dynamics of animal nutrition. The Biochem. Journ. **1**. 123 (1906).

halbe Stunde mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler. Der Alkohol wird dann dekantiert, das zurückgebliebene Pulver mit 300 bis 400 *cm*³ Wasser auf dem Wasserbad erwärmt. Das Na_2SO_4 und die nicht koagulierten Eiweißkörper gehen in Lösung.

F. Blum und *R. Gruetzner*[1]) bedienen sich des Acetons zur Eiweißfällung aus Blut bzw. Serum oder Organsäften, im speziellen Falle zur Bestimmung von nicht an Protein gebundenem Jod. Sie verfahren wie folgt: Auf 1 Vol. des durch Ammonium- oder Natriumoxalat ungerinnbar gemachten Blutes (zirka 0·1%) werden 4 Vol. reines Acetons unter Umrühren zugegossen bzw. es wird das Blut direkt in Aceton aufgefangen. Koagulation tritt sofort ein. Von dem sich alsbald feinflockig absetzenden Koagulum wird nach etwa einstündigem Stehen abfiltriert (*Nutsche*) und das Koagulum mit 80%igem Aceton nachgewaschen; es empfiehlt sich, den Filterrückstand — ohne ihn etwa vorher trocken werden zu lassen — nochmals mit 80%igem Aceton zu digerieren. Das Verhältnis Aceton zu Blut wie 4:1 erwies sich als optimal. Ansäuern (etwa mit Essigsäure) empfiehlt sich bei Blut nicht (wegen eventueller Extraktion von Blutfarbstoff), wohl aber bei sonstigen proteinhaltigen Flüssigkeiten. Jedes Erwärmen ist zu vermeiden. Die Methode ist sparsam, da das Aceton restlos durch Abdestillieren wiedergewonnen wird. Von organischen Lösungsmitteln können auch Benzylalkohol[2]) und Essigester[3]) zur Proteinfällung dienen.

Viel benutzte Fällungsmittel sind die Schwermetallsalze: Quecksilberchlorid, Eisenchlorid, Eisenacetat, Kupfersulfat, Kupferacetat, Bleiacetat, Zinkacetat, Uranylacetat u. a. m. Auf einige häufig angewandte Methoden, die auf der fällenden Eigenschaft dieser Stoffe beruhen, werden wir unten zurückkommen, hier mögen nur einige Vorschriften bei den Arbeiten mit denselben, die von *H. Schjerning*[4]) ausgearbeitet sind, zur allgemeinen Orientierung ihren Platz finden, obgleich keineswegs nur diese Bedingungen zum Ziele führen.

Die Ausführung der Fällungen muß in sauer reagierender Lösung geschehen; eine neutral reagierende Eiweißlösung muß man zuerst mit der Säure des Fällungsmittels neutralisieren. Die Eiweißlösung muß genügend (auf etwa 0·5% Eiweißgehalt) ver-

[1]) *F. Blum* und *R. Gruetzner*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**. 464 (1913).

[2]) Vgl. *T. Jacobson*: Compt. rend. soc. de biol. **83**. 255 (1920).

[3]) Vgl. *A. Marie*: Bull. Sciences Pharm. **27**. 135 (1920).

[4]) *H. Schjerning*: Methode zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Proteinindividuen in Bierwürze und anderen Proteinlösungen. Zeitschr. f. analyt. Chem. **37**. 413 (1898); Beiträge zur Chemie der Proteinfällungen. Ebenda. **36**. 643 (1898); **37**. 73 (1908); Einige kritische Untersuchungen über die quantitativen Fällungsverhältnisse verschiedener Proteinfällungsmittel. Zeitschr. f. analyt. Chem. **39**. 545 (1900); vgl. auch *B. Laszczynsky* Über das Vorkommen eines peptonisierenden Enzyms im Malz und Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen Bestandteile im Malz, Würze und Bier. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **22**. 123, 140 (1899).

dünnt werden; sie muß auch bei der Fällung mit Zinnchlorür, Bleiacetat, Ferriacetat genügende Mengen von Elektrolyten enthalten. Für die einzelnen Fällungen wäre folgendes zu beachten.

F ä l l u n g m i t B l e i a c e t a t. (Die Bleiacetatlösung enthält zirka 10% normales Bleiacetat und 10 bis 12 Tropfen 45%ige Essigsäure pro Liter.) Zu 25 *cm*³ Proteinlösung wird eine passende Menge (für Eieralbumin zirka 0·2 *cm*³, für Milch 4 bis 5 *cm*³) Bleiacetat zugesetzt. Von diesem muß soviel zugefügt werden, daß der Niederschlag sich sammelt und das klare Filtrat noch Blei enthält. Ein größerer Überschuß an Bleiacetat ist jedoch zu vermeiden, da sonst ein Teil des Niederschlages wieder aufgelöst wird. Nach dem Zusatz von Bleiacetat (bei aschearmem Eiweiß ist ein vorheriger Zusatz von Natriumphosphatlösung nötig) wird aufgekocht, filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Der Bleiniederschlag ist in der Fällungsflüssigkeit etwas löslich.

F ä l l u n g m i t M e r c u r i c h l o r i d. (5%ige Lösung.) In 25 *cm*³ Proteinlösung werden zirka 5 *cm*³ Quecksilberchloridlösung gesetzt. Die Mischung wird mehrere Stunden (4 bis 20) bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Niederschlag wird dann auf einem Filter gesammelt und mit einer kalten, zirka 0·5% haltigen Mercurichloridlösung ausgewaschen. Beim Abdestillieren mit *Kjeldahl* ist auf die Mercuriamidverbindungen Rücksicht zu nehmen. M e r c u r i n i t r a t, das von *G. Patein*[1]) zum Klärungsmittel bei der polarimetrischen Untersuchung des Harnes vorgeschlagen wurde, entfernt gleichzeitig die Eiweißkörper, wie auch Peptone und Gallenfarbstoffe (gleichwie Bleiacetat; nicht β - Oxybuttersäure und Homogentisinsäure). Behufs Fällung bereitet man die Mercurinitratlösung auf folgende Weise: In eine geräumige Porzellanschale werden 160 *cm*³ konzentrierter HNO_3 (spezifisches Gewicht 1·39) und in kleinen Portionen 220 *g* rotes Quecksilberoxyd unter lebhaftem Umrühren zugesetzt, dann das Ganze langsam zum Kochen erhitzt. Wenn alles gelöst ist, wird die Lösung abgekühlt, mit 60 *cm*³ 5%iger Natronlauge versetzt, bis zu einem Liter mit Wasser aufgefüllt, filtriert und die Lösung in einer braunen Flasche aufbewahrt. Von dieser Lösung werden mit 25 *cm*³ 50 *cm*³ Harn gefällt, darauf Natronlauge zugesetzt, bis die Reaktion auf Lackmus neutral reagiert.

Ebenso wirksam zur Entfernung von Albumosen und Peptonen, wie $Hg(NO_3)_2$, fand *E. Last*[2]) das Quecksilberchlorid in neutraler Lösung (2 *g* $Hg\,Cl_2$ auf 1 *g* Pepton); *Last* erhielt die besten Resultate

[1]) *G. Patein* und *E. Dufau*: Die Bestimmung des Zuckers im Harn von Diabetikern. Journ. Pharm. Chim. (6.) **10.** 433; Chem. Zentralbl. **1900.** I. 69. (Vgl. auch Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **128.** 375 [1899.]) Siehe auch die Arbeit von *A. C. Andersen*: Über die *Bang*sche Methode der Zuckerbestimmungen und ihre Verwendung zur Harnzuckerbestimmung. Biochem. Zeitschr. **15.** 76 (1908).

[2]) *Erwin Last*: Biochem. Zeitschr. **93.** 66 (1919).



bei Zusatz von 80 *cm*³ einer 5%igen $HgCl_2$-Lösung zu 100 *cm*³ einer 2%igen Pepton-*Witte*-Lösung. Völlig abiuret werden aber die Filtrate nicht. Diesen Punkt erreichen *C. Neuberg* und *Kerb*[1]) durch Anwendung von Mercuriacetat in schwach sodaalkalischer Lösung, wobei nachträgliche Fällung mit Phosphorwolframsäure (0·5% nach *C. Neuberg* und *Ishida*[2]) nicht mehr nötig ist. Zur Fällung wird eine 25%ige Lösung von Mercuriacetat und eine gesättigte oder 10%ige Sodalösung (Zufügen bis deutlich Lackmusblau!) angewandt.

Fällung mit Ferriacetat. In einem geräumigen Becherglas werden 40 *cm*³ der verdünnten Essigsäure und 50 bis 100 *cm*³ destilliertes Wasser abgemessen und hierin 0·8 *g* lamelliertes Ferriacetat gelöst. Nach der Lösung läßt man unter Umrühren aufkochen, hierauf gibt man 20 *cm*³ der Eiweißlösung hinzu, läßt wieder aufkochen, filtriert sogleich und wäscht drei- bis viermal mit siedendem Wasser aus. Das Filtrat muß klar und nicht durch übrig gebliebenes Eisenoxydsalz gefärbt sein. Ist dies (bei aschearmen Eiweißlösungen) nicht der Fall, so muß man unmittelbar nach dem Zusatz der Eiweißlösung und Aufkochenlassen der Flüssigkeit unter ununterbrochenem Umrühren und Kochen 15 bis 25 *cm*³ Natriumphosphatlösung zusetzen und wie vorher behandeln.

Fällung mit Uranacetat. (10%ige Lösung.) Zu 25 *cm*³ Eiweißlösung gibt man 20 bis 25 *cm*³ Uranacetatlösung. Die Mischung wird unter Umrühren zum Kochen erwärmt, einige Stunden lang oder bis zum folgenden Tag an einer dunklen Stelle bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen, filtriert und mit einer kalten 1- bis 2%igen Uranacetatlösung gewaschen[3]).

Fällung mit Magnesiumsulfat. Zu 20 *cm*³ Eiweißlösung werden 5 bis 6 Tropfen 45%iger Essigsäure gesetzt, die Mischung bei 30 bis 36° in einem Wasserbad gehalten, hierzu unter Umrühren 18 bis 20 *g* pulverisiertes, reines $MgSO_4$ ($MgSO_4 + 7 H_2O$) gegeben und unter wiederholtem Umrühren eine halbe bis eine Stunde bei dieser Temperatur stehen gelassen. Dann wird filtriert und das Filtrat mit einer kalten gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat, die 4 bis 5 *g* 45%iger Essigsäure pro Liter enthält, ausgewaschen.

Die Fällung mit dem *Stutzer*schen Reagens[4]) (Kupfersulfat wird in wässeriger Lösung mit Ätznatron gefällt und nach voll-

[1]) *C. Neuberg* und *Kerb*: Biochem. Zeitschr. **40**. 498 (1912); **67**. 119 (1914).

[2]) *C. Neuberg* und *Ishida*: Biochem. Zeitschr. **37**. 142 (1911).

[3]) *N. Kowalewsky*: Essigsaures Uranoxyd, ein Reagens auf Albuminstoffe. Zeitschr. f. analyt. Chem. **24**. 551 (1885); *M. Jacoby*: Über das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere. Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**. 135 (1900).

[4]) *A. Stutzer*: Untersuchungen über die quantitative Bestimmung des Proteinstickstoffes und die Trennung der Proteinstoffe von anderen in Pflanzen vorkommenden Stickstoffverbindungen. Journ. f. Landw. **28**. 103

ständigem Auswaschen des Alkalis aus dem Kupferhydroxyd dieses unter einer Lösung von 10% Glycerin enthaltendem Wasser aufgehoben) besteht im wesentlichen darin, daß man 1 *g* durch ein Millimetersieb geriebene Pflanzensubstanz mit 100 *cm*³ Wasser übergießt, bis zum Sieden erhitzt und, nachdem die Flüssigkeit halb erkaltet ist, mit etwas (0·3 bis 0·4 *g*) $Cu(OH)_2$ versetzt. Ist die mit dem Cuprihydroxyd versetzte Flüssigkeit kalt geworden, so filtriert man sie durch ein stickstofffreies Filter und bestimmt den Stickstoffgehalt des mit Wasser gewaschenen Niederschlages nach *Kjeldahl*.

Bei der Fällung der Albumosen mit Zinksulfat fügt man vorteilhaft zu 100 *cm*³ der Eiweißlösung 2 *cm*³ H_2SO_4 (1 Vol. konzentrierter H_2SO_4, 4 Vol. Wasser). Die angesäuerte Lösung wird in der Kälte mit feingepulvertem Zinksulfat gesättigt, das Gemisch 24 Stunden stehen gelassen[1]).

Sehr häufig werden die sogenannten Alkaloidreagenzien, Gerbsäure, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, ferner Jodjodwasserstoffsäure, Jodwismut-, Jodkadmium-, Jodquecksilberjodwasserstoffsäure, dann Ferrocyanwasserstoffsäure, Trichloressigsäure, Pikrinsäure, Asaprol, zur Enteiweißung benutzt. Bei der Fällung mit Gerbsäure wird die Eiweißlösung zuerst mit ein wenig $MgSO_4$ versetzt, mit Essigsäure angesäuert und dann mit einer geringen Menge — ein größerer Überschuß ist zu vermeiden — 10%iger Gerbsäurelösung versetzt. *Cathcart* und *Leathes*[2]) verfahren in Anlehnung an *Hedin* bei der Enteiweißung des Blutes mittels Gerbsäure auf die Weise, daß sie zu 20 *cm*³ Blut 25 *cm*³ einer 20%igen Gerbsäurelösung, die zugleich 5% Essigsäure enthält, hinzufügen; man läßt die Mischung 24 Stunden in einer geschlossenen Flasche stehen. Die „Albumosen" werden von Gerbsäure alle gefällt, der Gerbsäureniederschlag der „Protalbumose" ist jedoch im Überschuß löslich. In konzentrierter Lösung von Pepton erzeugt Gerbsäure eine in Essigsäure lösliche Fällung[3]).

(1881); Untersuchungen über die Verdaulichkeit und die quantitative Bestimmung der Eiweißstoffe. Journ. f. Landw. **29**. 473 (1881). Nach *Ritthausen* (Zeitschr. f. analyt. Chem. **17**. 241) werden zur Enteiweißung der Milch 25 *cm*³ derselben mit 400 *cm*³ Wasser verdünnt, mit 10 *cm*³ *Fehling*scher Cuprisulfatlösung und 6·5 bis 7·5 *cm*³ einer Kali- oder Natronlauge versetzt, die 14·2 *g* KOH oder 10·2 *g* Na OH im Liter enthält. Die Flüssigkeit muß nach Absetzen des Niederschlages ganz schwach sauer oder neutral, nicht aber alkalisch reagieren.

[1]) *A. Bömer*: Zinksulfat als Fällungsmittel für Albumosen. Zeitschr. f. analyt. Chem. **34**. 562 (1895); *K. Baumann* und *A. Bömer*: Über die Fällung von Albumosen mit Zinksulfat. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrgs.- u. Genußm. **1**. 106 (1898). Vgl. auch *E. Zuntz*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**. 219 (1899). Vgl. dazu ferner *F. Lippich*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**. 360 (1911); **90**. 236 (1914).

[2]) *E. P. Cathcart* und *J. B. Leathes*: On the absorption of proteins from the intestine. Journ. of Physiol. **33**. 462 (1906); *Hedin*: Journ. of Physiol. **30**. 155 (1903); **32**. 468 (1905).

[3]) Vgl. *O. Cohnheim*: Chemie der Eiweißkörper. 2. Aufl. S. 86 (1904).

Bei der Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes der Milch werden nach *Sebelien*[1]) 5 bis 10 cm^3 Milch mit mindestens 9 Vol. Wasser verdünnt, mit etwas Kochsalzlösung versetzt und in der Kälte mit *Almén*scher Gerbsäurelösung (4 g Gerbsäure in 8 cm^3 25%iger Essigsäure gelöst und 190 cm^3 40- bis 50%igen Alkohols hinzugefügt) im Überschuß (zirka eineinhalbfach der Mischmenge) gefällt.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure (5- bis 10%ige Lösung) erfolgt in Gegenwart von 2·5 bis 5% Salz- oder Schwefelsäure. Monoaminosäuren werden erst aus verhältnismäßig konzentrierten Lösungen durch Phosphorwolframsäure gefällt[2]). Über die Löslichkeit der phosphorwolframsauren Niederschläge von Amiden in heißem Wasser siehe *A. Stutzer*[3]). Peptone, Diaminosäuren werden ebenfalls gefällt; die Niederschläge sind im Überschuß des Lösungsmittels teilweise löslich. Spezielle Angaben haben bei der Verschiedenheit der benutzten Phosphorwolframsäuren wenig Wert.

Hier sei erwähnt, daß *Graves* und *Kober*[4]) sich einer 3%igen Sulfosalicylsäurelösung bei der Enteiweißung von Blut zwecks Bestimmung der Purinbasen bedient haben. Sie fällten durch Hinzufügen von 5 Vol. dieser Lösung. Die Hauptmenge des Niederschlages läßt sich durch ein bis zwei Minuten langes Zentrifugieren entfernen; durch Schütteln mit wenig Talkum wird die Flüssigkeit völlig klar. Das gleiche Reagens benutzt *Boyer*[5]) zur Bestimmung von Eiweiß in der Cerebrospinalflüssigkeit, und zwar in einer Lösung, die auf 100 cm^3 Wasser 13 g Sulfosalicylsäure und 15 cm^3 reine Schwefelsäure enthält.

Von den allgemein gebräuchlichen Methoden zur Entfernung des Eiweißes seien die folgenden angeführt.

---

[1]) *J. Sebelien*: Studien über die analytische Bestimmung der Eiweißkörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 135 (1889). Vgl. auch die Arbeiten von *Ritthausen*: Journ. f. prakt. Chem. N. F. **15**. 329 (1877); *I. Munk*: Zur quantitativen Bestimmung der Eiweiß- und Extraktivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. *Virchows* Arch. **134**. 501 (1893); *A. Schloßmann*: Über die Eiweißstoffe der Milch und die Methoden ihrer Trennung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. 197 (1896). Zur Fällung mit Nitroprussidnatrium ist ferner zu vergleichen *V. Arnold*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 300 (1911); zur Fällung mit Quecksilberjodidjodkali *L. Valley*: Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **155**. 417 (1912); zur Fällung mit Pikrinsäure *R. Labbé* und *R. Maguin*: Compt. rend. de l'Acad. des sciences. **156**. 1415 (1913).

[2]) *P. A. Levene* und *W. Beatty*: Über die Fällbarkeit der Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**. 149 (1906); vgl. ferner *R. Clogne*: Journ. Pharm. et Chim. (7.) **16**. 326 (1917).

[3]) *A. Stutzer*: Zur Analyse der in Handelspeptonen vorhandenen stickstoffhaltigen Bestandteile. Zeitschr. f. analyt. Chem. **31**. 501 (1892); vgl. auch *E. Mallet*: Zeitschr. f. analyt. Chem. **38**. 730 (1899).

[4]) *S. St. Graves* und *Ph. Ad. Kober*: Journ. Amer. Chem. Soc. **37**. 2430 (1915).

[5]) *Boyer*: Journ. Pharm. et Chim. (7.) **17**. 227 (1918).

Devoto[1]) versetzt 100 *cm*³ der eiweißhaltigen Flüssigkeit mit 80 *g* kristallisiertem Ammonsulfat, bringt das Salz in der Wärme in Lösung, dann wird die Flüssigkeit 30 bis 40 Minuten dem Dampf siedenden Wassers ausgesetzt, worauf die Koagulation, die von der Reaktion der Lösung unabhängig ist, vollendet ist. Läßt man die Flüssigkeit noch länger, bis zwei Stunden, im Dampf verweilen, so wird das Koagulum dichter, das Filtrieren und Auswaschen leichter. Das eiweißfreie Filtrat kann auf Peptone untersucht werden. (Vgl. auch „Peptonnachweis im Harn".) *Salkowski*[2]) entfernt das Eiweiß aus dem Harn, indem er 100 *cm*³ Harn mit 20 *g* gepulvertem Kochsalz, darauf mit dem doppelten Volumen einer Mischung von 7 Vol. gesättigter Kochsalzlösung und 1 Vol. 30%iger Essigsäure versetzt, wiederholt stark schüttelt und 15 bis 20 Minuten filtriert.

Nach einer Angabe von *Hofmeister*[3]) wird die eiweißhaltige Lösung zunächst durch Kochen bei schwach saurer Reaktion von der Hauptmenge des Eiweißes befreit, darauf das Filtrat mit Bleihydrat versetzt, einige Minuten im Kochen erhalten und wieder filtriert. Die so erhaltene Flüssigkeit, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, von gelöstem Blei, durch Aufkochen von überschüssigem H_2S befreit, erweist sich als eiweißfrei. Enthält die ursprüngliche Lösung schwefelsaure oder phosphorsaure Salze in großer Menge, so empfiehlt es sich, vor dem Kochen mit Bleihydrat einige Tropfen Bleizuckerlösung zuzusetzen.

Nach dem Verfahren von *Schmidt-Mühlheim* und *Hofmeister*[4]) werden die Eiweißkörper mit essigsaurem Eisen gefällt. Der verdünnten Blutflüssigkeit werden einige Kubikzentimeter konzentrierte essigsaures Natrium und konzentrierte Eisenchloridlösung bis zur bleibenden roten Farbe zugesetzt, dann kohlensaures Natrium bis zur schwach sauren Reaktion aufgekocht und filtriert. Die gesamten Filtrate werden noch einmal erwärmt, einige Tropfen der Eisenchloridlösung zugefügt, wieder filtriert. *Seegen* führt die Methode so aus, daß er 50 *cm*³ Blut mit der acht- bis zehnfachen Menge Wasser verdünnt, die Flüssigkeit bis zur beginnenden Dampfbildung erwärmt, dann 4 bis 5 *cm*³ konzentrierte Eisenchloridlösung (90 *g* auf 500 *cm*³ Wasser) und 15 *cm*³ Natriumacetatlösung (130 *g*

[1]) *L. Devoto*: Über den Nachweis des Peptons und eine neue Art der quantitativen Eiweißbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**. 465 (1891).
[2]) *E. Salkowski*: Über ein Verfahren zur völligen Abscheidung von Eiweiß ohne Erhitzen. Zentralbl. f. med. Wiss. **1880**. S. 690.
[3]) *Fr. Hofmeister*: Über ein Verfahren zur völligen Abscheidung des Eiweißes aus tierischen Flüssigkeiten Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**. 288 (1878). Ferner: Zur Lehre vom Pepton. Ebenda. **4**. 252 (1880).
[4]) *A. Schmidt-Mühlheim*: Beitrag zur Kenntnis des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung. Arch. f. Anat. u. Phys. **1879**. S. 39; **1880**. S. 33; *P. Müller*: Zur Trennung der Albumosen von den Peptonen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**. 48 (1898/99); *Fr. Hofmeister*: l. c.

auf 500 *cm*³ Wasser) und so viel kohlensaures Natrium unter Umrühren zufügt, bis ein sehr empfindliches blaues Lackmuspapier eine eben nur minimale Reaktion anzeigt. Dann wird aufgekocht, filtriert, der Rückstand sorgfältig ausgepreßt und gewaschen.

Die von *Seegen*[1]) angegebene Methode besteht darin, daß eine Blutportion (50 *cm*³) in einer Porzellanschale mit der acht- bis zehnfachen Menge destillierten Wassers verdünnt und dann so viel Essigsäure (zirka 5 *cm*³ konzentrierte Essigsäure) hinzugegeben wird, bis Lackmuspapier sehr grell gerötet wird. Darauf wird die Flüssigkeit zum Kochen erhitzt oder mindestens bis die Blutfarbe ganz verschwunden ist und die Flüssigkeit tief dunkel, nahezu schwarz ist. Nun wird kohlensaures Natrium (9 bis 10 *cm*³ einer 20%igen Lösung) zu der Flüssigkeit gefügt, und zwar so lange, bis die ganze Flüssigkeit infolge des gebildeten Koagulums milchkaffeebraun ist. Wenn diese Farbe auftritt, so ist die Ausscheidung von Eiweiß beendet.

Nach *Bernard*[2]) wird zu einer gewogenen, in einem Porzellanschälchen befindlichen Blutmenge die gleiche Gewichtsmenge Glaubersalz gegeben und das Schälchen erhitzt, wobei sich eine schwarze krümelige Masse bildet. Das Filtrat davon ist klar und frei von Eiweiß. *F. Röhmann*[3]) verwendet beim Enteiweißen ebenfalls Glaubersalz. In einem graduierten Mischzylinder von 50 *cm*³ Inhalt werden zirka 15 *cm*³ kaltgesättigter Glaubersalzlösung abgemessen, der Zylinder mit der Salzlösung gewogen und in ihm das Blut (etwa 35 *cm*³) aufgefangen, der Zylinder wieder gewogen, das Blut + Na_2SO_4-Gemisch (50 *cm*³) in eine emaillierte Eisenschale gegossen und mit 150 *cm*³ Wasser verdünnt. Zu dieser Flüssigkeit fügt man sehr verdünnte Essigsäure (und zwar auf 50 *cm*³ des Gemisches 8 bis 10 *cm*³ der auf das 20fache mit destilliertem Wasser verdünnten offizinellen Essigsäure). Das Gemisch wird unter stetem Umrühren auf einem stark kochenden Wasserbade erhitzt, bis eine vollkommene, feinflockige Gerinnung eintritt.

Sehr viel angewendet wird auch das Verfahren von *Fr. Schenck*[4]). Zu einem abgemessenen Quantum Blut oder Serum (50 *cm*³) mit dem gleichen Volumen Wasser vermischt, wird so viel Salzsäure und Sublimat (etwa die doppelte Menge 2%iger HCl und die doppelte Menge 5%iger Sublimatlösung) gesetzt, bis weiterer Zusatz das Filtrat nicht mehr trübt, alsdann die ganze Flüssigkeit zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt. Aus dem Filtrate wird das Queck-

---

[1]) *J. Seegen*: Über eine neue Methode der Blutenteiweißung zum Behufe der Zuckerbestimmung. Zentralbl. f. Physiol. **6**. 604 (1893).

[2]) Zitiert nach *Seegen*.

[3]) *Fr. Röhmann*: Über die Bestimmung des Zuckers im Blut. Zentralbl. f. Physiol. **4**. 12 (1891).

[4]) *Fr. Schenck*: Über die Zuckerbestimmung im Blute. *Pflügers* Arch. **47**. 621 (1890); vgl. auch *Pflügers* Arch. **55**. 203 (1894).

silber nach mehrstündigem (höchstens 24stündigem) Stehen[1]) durch Durchleiten von Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat nach Entfernung des Schwefelwasserstoffes durch einen Luftstrom wieder filtriert, sein Volumen festgestellt und im Vakuum bei schwach saurer Reaktion eingeengt.

Die Methoden von *Seegen*, *Röhmann*, *Schenck* wurden hauptsächlich als Vorbereitung zur Zuckerbestimmung in der enteiweißten Flüssigkeit benutzt. Vortreffliche Dienste in dieser Richtung leistet auch das Verfahren von *Abeles*[2]). Erforderlich dazu ist eine Lösung von Zinkacetat in absolutem Alkohol, wozu ein dem zu untersuchenden Blute gleiches Volumen an absolutem Alkohol und 5% vom Gewichte des Blutes an Zinkacetat verwendet werden, das ist 0·05 *g* Zinkacetat auf 1 *g* Blut. Die trübe Flüssigkeit wird als solche verwendet. Bei 90- bis 95%igem Alkohol ist entsprechend mehr zu nehmen; ein Plus von Alkohol schadet nicht. Will man das Blut des lebenden Tieres in möglichst unverändertem Zustande untersuchen, so bringt man die Lösung vom Zinkacetat in ein kleines Becherglas, in welchem ein für allemal ausgewertet worden ist, bis zu welcher Höhe ein Gemenge des verwendeten Alkoholvolums mit 50 cm^3 Wasser reicht, wägt dasselbe, läßt das Blut aus der Arterie oder Vene des Tieres bis zur markierten Höhe einfließen und wägt wieder. Ist mehr als 50 cm^3 abgenommen worden, so kann man nachträglich die noch erforderliche alkoholische Zinklösung zufließen lassen. Die Koagula müssen durch wiederholtes Waschen mit 90- bis 95%igem Alkohol und Auspressen gründlich extrahiert werden. Zu diesem Zwecke wird die Mischung umgerührt, die gleichmäßig schwarz gewordene Masse durch ein mit Alkohol angefeuchtetes Faltenfilter filtriert. Man wäscht mit 90- bis 95%igem Alkohol nach, bringt den Rückstand auf ein mit Alkohol angefeuchtetes Stück Leinwand und preßt mit der Handpresse scharf aus. Der Preßrückstand wird, so gut es geht, aus dem Papier geschält, in einer Schale mit dem Pistill zerdrückt, mit Alkohol zu einem feinen Schlamm zerrieben und auf ein neues Faltenfilter gebracht. Auch das abgelöste Papier wird mit den daran haftenden Resten des Koagulums mit Alkohol zerrieben, dieses sowie das durch das Auspressen gewonnene gleichfalls aufs Filter gebracht, nachgewaschen, die Masse nochmals ausgepreßt, die abrinnende Flüssigkeit, wenn nötig, filtriert, mit den früheren Filtraten vereinigt.

Die gesamten, gewöhnlich etwas trüben Flüssigkeiten enthalten überschüssiges Zink, das man mit kohlensaurem Natrium

[1]) Vgl. *E. Liefmann* und *R. Stern*: Glykämie und Glykosurie. Biochem. Zeitschr. **1**. 299 (1906).

[2]) *M. Abeles*: Über ein Verfahren zum Enteiweißen des Blutes für die Zuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**. 494 (1891).



ausfällt. Man verwendet davon eine Lösung 1:5 und setzt unter Umrühren so lange zu, bis die Reaktion deutlich alkalisch geworden ist. Das ausfallende kohlensaure Zink sowie das überschüssige herausfallende kohlensaure Natrium klären die Lösung. Das Filtrat, das bei 50 *cm*³ Blut gewöhnlich 250, höchstens 300 *cm*³ beträgt, wird mit Essigsäure schwach angesäuert, auf 20 bis 30 *cm*³ eingedampft, wobei sich zum Schluß etwas Unlösliches ausscheidet. Man spült die Flüssigkeit in einen Maßzylinder, setzt neuerdings drei bis vier Tropfen einer konzentrierten wässerigen Lösung von Zinkacetat oder Chlorzink zu und versetzt mit kohlensaurem Natrium bis zum Eintritt der alkalischen Reaktion. Sodann füllt man bis auf das ursprüngliche Volumen auf und filtriert durch ein trockenes Filter; das Filtrat kann sofort zum Titrieren verwendet werden.

Bei der Enteiweißung des Harnes zur nachfolgenden Untersuchung auf Albumosen bedienten sich *Morawitz* und *Dietschy*[1]) folgenden Verfahrens. 500 *cm*³ mit saurem phosphorsaurem Kalium schwach angesäuerter Urin werden mit dem doppelten Volumen 96%igem Alkohol im Wasserbade, fünf bis sechs Stunden, bei einer Temperatur von 80 bis 90° erhitzt. Nach dem Erkalten wird filtriert, das Filtrat bei 50 bis 60° auf etwa 300 *cm*³ eingeengt, dann nach Hinzufügung von wenig verdünnter Schwefelsäure (2 *cm*³ auf 100 *cm*³ Urin) mit Zinksulfat in Substanz gesättigt. Es wird filtriert, der Niederschlag zur Entfernung des Urobilins 24 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert. Die Methode kann auch für Blut angewendet werden. 250 *cm*³ Blut werden in zirka 5 *l* auf 80° erhitzter physiologischer Kochsalzlösung, die mit etwas Kaliumphosphat schwach angesäuert war, in dünnem Strahl unter energischem Rühren aufgefangen, das Filtrat bei 50 bis 60° auf zirka 1 *l* eingeengt und wie der Harn mit Alkohol und Zinksulfat weiter behandelt. Ähnlich verfahren *G. Embden* und *F. Knoop*[2]) bei der Untersuchung der Darmschleimhaut auf Albumosen. Die gründlichst gereinigten Darmstücke werden in eine gemessene Menge am Rückflußkühler siedender 1%iger Lösung von primärem Kaliumphosphat geworfen und in dieser zunächst zehn Minuten lang im Sieden erhalten. Nachdem die Flüssigkeit halbwegs abgekühlt ist, wird das koagulierte Darmstück herausgenommen, in einer Reibschale mit der Schere und mit dem Pistill möglichst zerkleinert, unter Vermeidung jedes Verlustes in die Flüssigkeit zurückgebracht und in dieser nochmals 20 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Volumen der den Darm ent-

[1]) *Morawitz* und *Dietschy*: Über Albumosurie, nebst Bemerkungen über das Vorkommen der Albumosen im Blute. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **54**. 88 (1906).

[2]) *G. Embden* und *F. Knoop*: Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand und über das Vorkommen von Albumosen im Blute. *Hofmeisters* Beitr. **3**. 120 (1903).

haltenden Flüssigkeit genau gemessen und nach mehr-, bis 24stündigem Stehen ein aliquoter, gemessener Teil mit dem halben Volumen gesättigter Zinksulfatlösung, der auf 100 Teile 0·4 Teile konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt worden sind, versetzt. Hierbei werden der Koagulation entgangene Globulinreste, wie auch etwaige Reste anderer fällbarer Eiweißkörper entfernt[1]). Bei der Prüfung des Blutserums auf Albumosen verfuhren *Hohlweg* und *Meyer*[2]) so, daß sie 50 cm^3 blutfarbstofffreies Serum mit 50 cm^3 einer Mischung von gleichen Teilen 1%iger Essigsäure und 5%iger Monokaliumphosphatlösung versetzten und nach Verdünnung mit 300 cm^3 Wasser und Zusatz von 400 cm^3 gesättigter Kochsalzlösung durch Kochen koagulierten. Die Flüssigkeit blieb nach der Koagulation einen Tag stehen.

Baglioni[3]) benutzte bei seinen Untersuchungen über die Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten der Seetiere zur Enteiweißung das A s a p r o l. Die Asaprollösung wurde nach den Angaben von *Riedel*[4]) bereitet (10 *g* Asaprol + 100 cm^3 Wasser + 10 cm^3 konzentrierte Salzsäure); wenige Tropfen genügten, um alle Eiweißkörper der untersuchten Flüssigkeit zu fällen; Albumosen und Peptone werden mitgefällt.

Eine Reihe von Methoden zur Entfernung der Eiweißkörper aus ihren Lösungen, die von *Michaelis* und *Rona*[5]) eingeführt worden sind, beruht auf der Eigenschaft der Proteine, als kolloidale Körper durch andere Kolloide bzw. Suspensionen durch Adsorption gebunden und mitgerissen zu werden. Dieser Prozeß vollzieht sich bei gewöhnlicher Temperatur, wodurch das lästige und oft nicht indifferente Erhitzen der Eiweißlösung wegfällt, und da das Eiweiß mit dem zugefügten Adsorbens z u s a m m e n ausfällt, so ist die schließlich erhaltene eiweißfreie Flüssigkeit von fremden Zutaten, bis auf ganz geringe Mengen von Elektrolyten, frei. Die Eiweißkörper können ihrem amphoteren Charakter gemäß sowohl von anodischen wie von kathodischen Kolloiden bzw. Suspensionen gefällt werden. Bei der Enteiweißung mit Kaolin[6]) werden 50 cm^3

---

[1]) Vgl. *K. Glaessner*: *Hofmeisters* Beitr. **1**. 328 (1901); Über die Umwandlung der Albumosen durch die Magenschleimhaut; *O. Cohnheim*: Die Umwandlung des Eiweißes durch die Darmwand. Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**. 451 (1901).

[2]) *H. Hohlweg* und *H. Meyer*: Quantitative Untersuchung über den Reststickstoff des Blutes. *Hofmeisters* Beitr. **11**. 381 (1918).

[3]) *S. Baglioni*: Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung verschiedener Körperflüssigkeiten von Seetieren. *Hofmeisters* Beitr. **9**. 50 (1907).

[4]) *F. Riegel*: Asaprol, ein Reagens auf Eiweiß, Albumosen, Peptone, Pepsin. Wiener klin. Wochenschr. **7**. 981 (1894).

[5]) Weitere Beiträge zur Methodik der Enteiweißung. Biochem. Zeitschr. **5**. 365 (1907).

[6]) *L. Michaelis* und *P. Rona*: Untersuchungen über den Blutzucker. I. Biochem. Zeitschr. **7**. 329; II. Ebenda. **8**. 356 (1908).

Blutplasma oder Blutserum mit der 12- bis 15fachen Menge Wasser verdünnt, mit Essigsäure schwach angesäuert (etwa so weit, bis die anfänglich entstehende Trübung sich wieder aufzuhellen beginnt). Zu der Flüssigkeit, deren Volumen genau festgestellt wird, fügt man dann auf je 100 *cm*³ Flüssigkeit 20 bis 25 *g* Kaolin in kleinen Portionen unter stetem tüchtigen Umschütteln hinzu. Nach Hinzufügen der gesamten Kaolinmenge ist das Enteiweißen vollendet und es kann alsbald abgenutscht werden. Die Flüssigkeit filtriert leicht und ist völlig klar. Spuren von Kaolin, die eventuell anfänglich durchgehen könnten, werden entweder durch Zurückgießen der ersten Filtrate oder erst nach dem Einengen des Filtrates durch nochmaliges Filtrieren entfernt. Man nutscht so weit wie möglich ab, notiert das Volumen des Filtrates genau (es beträgt gewöhnlich vier Fünftel der Gesamtflüssigkeit), engt es bei schwach saurer Reaktion bis zum nötigen Volumen auf dem Wasserbade oder im Vakuum ein, um die Zuckerbestimmung ausführen zu können. Bei der Enteiweißung mit dem elektropositiven kolloidalen Eisenhydroxyd [1]) (Ferrum oxydat. dialysat., Liquor ferri oxydatidialysat. — Der Liquor ferri oxychlorati, Pharm. Germ. ist nicht oder erst, nachdem man die Flüssigkeit bis zur Chlorfreiheit der Dialyse unterworfen hat, anwendbar) werden 50 *cm*³ Blutserum oder Plasma auf das 12- bis 14fache mit destilliertem Wasser verdünnt, das Volumen der Gesamtflüssigkeit genau notiert und ohne Änderung der Reaktion und ohne Hinzufügen irgendeines Salzes 40 *cm*³ Ferrum oxyd. dial. tropfenweise, unter lebhaftem Umschütteln hinzugefügt. Damit ist das Enteiweißen vollendet. Man filtriert durch ein Faltenfilter. Das wasserklare eiweiß- und eisenfreie Filtrat, dessen Volumen wieder genau festgestellt werden muß, wird schwach mit Essigsäure angesäuert und kann im Vakuum oder auf dem Wasserbad auf wenige (4 bis 6) Kubikzentimeter eingeengt werden, ohne daß die Flüssigkeit sich dunkler färben würde; die Lösung ist daher zum Polarisieren vortrefflich geeignet. Im Gegensatz zum Kaolin kann das kolloidale Eisenhydroxyd auch auf das Gesamtblut direkt angewendet werden. 30 bis 40 *g* Blut werden auf 1 *l* mit destilliertem Wasser verdünnt und unter Umschütteln mit der Eisenlösung versetzt. Auf je 1 *g* Hundeblut kommen 3 bis 4 *cm*³, auf je 1 *g* Kaninchenblut 2·5 bis 3 *cm*³ der Eisenlösung; ein Überschuß innerhalb gewisser Grenzen ist an sich unschädlich. Man kann auch vorteilhaft so verfahren, daß man das Blut zehnfach mit Wasser verdünnt, den Rest des Wassers zur Verdünnung der Eisenlösung benutzt und mit der verdünnten Eisenlösung enteiweißt. Die Bluteisenmischung bleibt nun unter

[1]) *P. Rona* und *L. Michaelis*: l. c. Biochem. Zeitschr. **7**. 329 (1908); *B. Oppler* und *P. Rona*: Untersuchungen. III. Ebenda. **13**. 121 (1908); *L. Michaelis* und *P. Rona*: Untersuchungen. IV. Ebenda. **14**. 476 (1908).

häufigem Umschütteln 10 bis 15 Minuten stehen; während dieser Zeit erfolgt bereits eine reichliche flockige Ausscheidung der Eiweißeisenverbindung. Jetzt setzt man 1 *g* $MgSO_4$ fein gepulvert oder in Lösung auf einmal hinzu und schüttelt kräftig ein bis zwei Minuten lang. Damit ist die Enteiweißung vollendet. Ist sie gut gelungen, so erfolgt die totale Ausscheidung schnell, und die darüber stehende klare, farblose Flüssigkeit ist zur Filtration fertig. Aber auch in Fällen, in welchen die mehr oder weniger ausgesprochene Färbung des Filtrates eine unvollständige Fällung des Hämoglobins anzeigt, kann nachträglich zu jeder Zeit eine Korrektur stattfinden mit sehr kleinen Mengen — einige Tropfen bis mehrere Kubikzentimeter — der Eisenlösung. Ein weiterer Elektrolytzusatz ist unnötig und auch nicht vorteilhaft, da er beim nachfolgenden starken Einengen stören könnte. Als Elektrolyt wählt man bei der Methode am besten ein Sulfat oder Phosphat, ferner Citrat, Tartiat u. a., da die mehrwertigen Anionen gegen das kathodische Eisenhydroxyd viel wirksamer sind als die einwertigen. Man kann zwischen dem Sulfat des Mg, Zn, Na, K, Cu wählen; im allgemeinen wäre wegen der großen Löslichkeit des Magnesiumsalzes dieses vorzuziehen, da es das Einengen der eiweißfreien Lösung auf ein sehr kleines Volumen ermöglicht. Bei nachträglicher Vergärung der Flüssigkeit oder bei einigen Zuckerbestimmungen mittels Reduktion wirkt das Mg sehr störend, und hier wird man sich des K-, oder Na-, oder des leicht entfernbaren Zinksalzes oder Kupfersalzes (am besten in Lösung) bedienen. Sowohl bei der Kaolin- wie bei der Eisenmethode wird ein großer Teil der Albumosen in irreversibler Weise mitgerissen, Zucker hingegen in keiner Konzentration. Diese Methoden werden also bei der Vorbereitung der betreffenden Flüssigkeiten (auch im Harn, in Milch, in aufgelösten Blutkörpern) für die nachträgliche Zuckerbestimmung angewendet.

Die Enteiweißung mittels Mastix[1]) gestaltet sich folgendermaßen. 50 cm^3 Serum werden unverdünnt mit 500 cm^3 Mastixlösung (10%ige klare alkoholische Mastixlösung mit der doppelten Menge Wasser durch plötzliches Zusammengießen verdünnt) versetzt und mit Essigsäure (20 cm^3 einer 10%igen Lösung) schwach angesäuert. Nach etwa halbstündigem Warten fügt man wieder dieselbe Menge Mastixlösung portionsweise hinzu, säuert wieder mit 20 bis 30 cm^3 10%iger Essigsäure an und gibt in Portionen 20 bis 30 cm^3 10%iger $MgSO_4$-Lösung hinzu, bis eine deutliche Flockung eintritt. Nach kurzer Zeit, eventuell nach Digerieren

[1]) *L. Michaelis* und *P. Rona*: Eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen, insbesondere zur Enteiweißung des Blutserums. Biochem. Zeitschr. **2**. 219 (1907). Ferner *P. Rona* und *L. Michaelis*: Weitere Beiträge zur Methode der Enteiweißung. Ebenda. **5**. 365 (1907).

im lauwarmen Wasserbade, ist die Flüssigkeit leicht und klar filtrierbar und frei von Eiweiß. Gesamtblut wird durch diese zweimalige Fraktionierung gewöhnlich noch nicht ganz enteiweißt. Es ist nötig, noch ein drittes Mal die gleiche Menge Mastix in Portionen nnd zum Schluß zur Erzielung einer guten Flockung noch einmal uach Bedarf Mg SO_4 zuzugeben. Auch hier wie bei der Kaolin- und der Eisenmethode wird der Niederschlag nicht ausgewaschen, sondern die Menge des erhältlichen Filtrates abgemessen und eventuell daran vorgenommene quantitative Bestimmungen auf die Gesamtmenge umgerechnet. Das Filtrat ist frei von Eiweiß, hingegen gehen Albumosen zum Teil, und zwar unter gewöhnlichen Verhältnissen zum größeren Teil (drei Viertel) in das Filtrat[1]). Um die im Niederschlag zurückgehaltenen Albumosen wiederzugewinnen, verfährt man folgendermaßen: Der Niederschlag wird auf einem Tonteller getrocknet und im *Soxhlet*schen Apparat mit Äther gründlichst, mindestens fünf bis sechs Stunden lang, unter mehrmaligem Wechseln des Äthers, extrahiert. Der abdestillierte Äther darf keinen Mastixrückstand mehr hinterlassen. Dann wird der Extraktionsrückstand wiederholt, bis das Waschwasser keine Biuretreaktion mehr gibt, mit Wasser gekocht, wobei die Albumosen in Lösung gehen.

Natürlich lassen sich die verschiedenen Methoden mannigfaltig kombinieren. So kann man bei der Mastixmethode so verfahren, daß man die Hauptmenge des Eiweißes zuerst durch Alkohol entfernt, nach Wegjagen des Alkohols den Rückstand mit lauwarmem Wasser digeriert und erst dann unter starkem Umrühren zu der wässerigen Lösung eine verdünnte Mastixemulsion (z. B. aus 10%igem, absolut alkoholischem Mastix und 500 cm^3 Wasser bereitet) hinzufügt. Bei Untersuchung größerer Flüssigkeitsmengen ist die vorherige Entfernung der Hauptmenge des Eiweißes mittels Alkohol oder durch Hitzekoagulation nicht zu umgehen. *Bang*[2]) kombiniert die Enteiweißung mittels Alkohol und die Kaolinmethode wie folgt: Ein Zentrifugierröhrchen von zirka 200 cm^3 Inhalt wird mit 100 cm^3 Alkohol beschickt und gewogen. Nach dem Zusatz von etwa 30 bis 50 cm^3 Blut direkt aus der Ader wird wieder gewogen. Man zerteilt die Blutkoagula fein mit dem Glasstabe, spült diesen mit zirka 50 cm^3 Alkohol ab und zentrifugiert eine Stunde. Diese Flüssigkeit wird von dem Rückstand, der fest an dem Röhrchen haftet, abgegossen und das Residuum wieder mit Alkohol zerrührt und

[1]) *P. Rona* und *L. Michaelis*: Beitrag zur Frage nach der kolloidalen Natur der Albumosenlösungen. Biochem. Zeitschr. **3**. 109 (1907). Ferner *L. Michaelis* und *P. Rona*: Über die Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten usw. Ebenda. **4**. 11 (1907); vgl. auch *E. Zuntz*: Contribution à l'étude des protéoses. Arch. intern. de Phys. **5**. 245 (1907).

[2]) *J. Bang*: Über die Bestimmung des Blutzuckers. Biochem. Zeitschr. **7**. 325 (1908).

zentrifugiert (drei viertel Stunde). Die Flüssigkeit wird abgegossen, der Rückstand zum dritten Male mit 50 *cm*³ Alkohol zerrührt und zentrifugiert (eine halbe Stunden). Die vereinigten Flüssigkeiten werden auf dem Wasserbade bis zirka 10 *cm*³ konzentriert, in einen Meßzylinder überführt und auf 30 bis 50 *cm*³ ergänzt. Man setzt 2 bis 3 *g* Kaolin am besten portionenweise hinzu, schüttelt durch und filtriert. Auch bei der Eisenmethode ist es gelegentlich von Vorteil, das eingeengte Filtrat vor dem Polarisieren mit ganz geringen Mengen (wenige Dezigramm) Kaolin durchzuschütteln und nochmals zu filtrieren. Auch bei der Eisenmethode ist es vorteilhaft, die verdünnte eiweißhaltige Lösung zuerst aufzukochen und dann erst einige Kubikzentimeter der verdünnten kolloidalen Eisenhydroxyd-Lösung zuzufügen. Vgl. den Abschnitt über Blutzucker, wo auch einige in diesem Abschnitt nicht erwähnte Enteiweißungsmethoden angeführt sind.

Tierische Pigmente und Farbstoffe.

Von **Franz Samuely** †.

Bearbeitet von **Eduard Strauss, Frankfurt a. M.**

Allgemeiner Teil.

Das Kapitel der „tierischen Farbstoffe" ist ein Kapitel der Entsagung chemischer Analyse und biochemischer Forschung.

Das heute vorliegende Material über tierische Farbstoffe, über ihre Verbreitung im Tierreich und über ihre physiologischen Beziehungen ist ein umfangreiches. Gegenüber der Fülle dieser Beobachtungen ist unser Wissen über die chemische Natur der meisten Farbstoffe und Pigmente ein bedauerlich geringes. Die Armut unserer Kenntnisse erklärt sich gewiß zum größten Teil durch die Schwierigkeit, ausreichendes und reines Material darzustellen. Die in den Geweben vorhandenen Farbbestandteile genügen oft nur, um ihre Existenz und einige ihrer Eigenschaften in geeigneten Lösungsmitteln nachzuweisen. Aber auch in Fällen größerer Materialvorräte hat bis jetzt entweder die Labilität der Substanzen oder die außergewöhnliche Resistenz derselben gegen chemische Agenzien jede ersprießliche chemische Bearbeitung unmöglich gemacht. Es wird daher alles das, was wir über die Methoden der Isolierung und Analyse tierischer Farbstoffe, besonders von den vielartigen Farbstoffen in der niederen Tierwelt berichten können, nur geringen Raum ausfüllen.

Für die eingehendere Beschreibung aller bekannten bzw. benannten Farbstoffe muß auf die Handbücher[1]) verwiesen werden; hier kann keine Vollständigkeit angestrebt werden.

Für die Farbstoffe der niederen Tiere ist vor allem die Monographie von *v. Fürth*[2]) maßgebend, in welcher der Chemiker auch die Fundorte der Tierspezies erschöpfend beschrieben findet.

Z u r M e t h o d i k d e r F a r b s t o f f i s o l i e r u n g seien einige Bemerkungen vorausgeschickt: Liegen die Farbstoffe in

---

[1]) *Abderhalden*: Biochem. Handlexikon. **6.** 293 **ff.** (1911). (Darstellung von *Franz Samuely* †.)

[2]) *O. v. Fürth*: Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. *Fischer*, 1903. (Ausführliche Literatur vgl. besonders Kap. IX, S. 491 **ff.**)

Lösungen vor, d. h. in Sekreten oder Exkreten, so besteht die Aufgabe der Darstellung in einer Fällung derselben in unlöslicher Form oder in einer Extraktion durch geeignete indifferente Lösungsmittel. Farbstoffe aber, die sich in Geweben amorph vorfinden, werden den feinzerteilten, eventuell vorher bei niederer Temperatur getrockneten und gepulverten Organteilen durch geeignete Lösungsmittel entzogen. Man versuche in allen Fällen zuerst Wasser und dann organische indifferente Solvenzien und vermeide nach Möglichkeit Alkalien oder Säuren, da diese leicht sekundäre Veränderungen hervorrufen. Doch sind auch Farbstoffe bekannt, die ohne Änderung ihrer Eigenschaften in Säuren oder Alkalien primär löslich sind. Andere hingegen, und dies gilt vor allem von den dunkelschwarz gefärbten Pigmenten in der Tierreihe, sind nur durch eine Veränderung ihrer primitiven chemischen Natur in Alkalien löslich.

Die Wahl des geeigneten Extraktionsmittels entscheidet bisweilen die Möglichkeit einer Reindarstellung und einer Kristallisation des tierischen Farbstoffes, da diese letztere nur bei Abwesenheit von kristallisationshemmenden Körpern (Eiweiß, Fette, Lipoide) gelingt.

Gehen gleichzeitig mehrere Farbstoffe in einem Extraktionsmittel in Lösung, so kann man durch Extraktion bei alkalischer oder saurer Lösung eine Trennung versuchen.

Jedenfalls versuche man zur ursprünglichen Extraktion möglichst viele Solvenzien, allein oder in gegenseitiger Kombination.

Gewinnt man reine Lösungen, deren Rückstand nicht kristallisationsfähig ist oder quantitativ nur spärlich ausfällt, so ist man auf die Feststellung qualitativer Reaktionen angewiesen. Spezialreaktionen bestimmter chemischer Farbstoffgruppen sind bis jetzt kaum bekannt. Nur für ganz wenige Substanzen, wie die Lipochrome oder die Uranidine, sind einige Klassenmerkmale vorhanden, die mehr oder weniger willkürlich eine Gruppenzugehörigkeit eines Farbstoffes gestatten oder einem Pigment eine spezifische Natur zuzuschreiben erlauben.

Die Mehrzahl qualitativer Reaktionen beruht auf Farbenänderung durch äußere Faktoren. Als solche kommen das eine Abblassung oder Metachromasie bedingende Licht und der Sauerstoff der Luft in Betracht. Gewisse Farbstoffe, wie die Lipochrome, sind außerordentlich lichtempfindlich. Bisweilen führt die Einwirkung von Licht (Sonnenlicht) auch zur Farbenveränderung oder Farbenvertiefung. Man bedenke in diesem Fall die Möglichkeit einer Farbenbildung aus einem ungefärbten Chromogen, wie dies für Urobilin und Purpurin festgestellt ist. In solchen Fällen versuche man das Chromogen bei diffusem Petroleumlicht oder im Dunkeln darzustellen. Andere Veränderungen der

ursprünglichen Eigenfarbe werden sehr leicht durch Wärme, Säuren oder Alkalien hervorgerufen. Auch hier ist zu beachten, ob es sich z. B. nach Ansäuern nur um einen Farbenumschlag handelt, der durch Neutralisieren der Lösung der ursprünglichen Farbe wieder weicht. In solchen Fällen kann der Farbstoff unter Umständen durch Lösen und Umfällen aus Alkalien mit Säuren gereinigt werden. Die Mehrzahl der Farbstoffe niederer Tiere aber wird durch diese Agenzien in ihrer elementaren Natur verändert. Die Farbenveränderung, die durch Alkalien, bisweilen aber schon durch Alkohol oder Äther auftritt, ist für manche Farbstoffe, wie z. B. die Uranidine, als Klassenmerkmal verwendet worden.

Das wertvollste Material der Farbstoffanalyse und Identifikation bietet die spektroskopische Beobachtung. In der Tat zeigen besonders die Farbstoffe der höheren Tiere (Blutfarbstoffe) und der Pflanzen (Chlorophyll) ganz spezifische und charakteristische Absorptionsspektren. Weniger günstig liegen die Verhältnisse bei den chemisch unaufgeklärten Farbstoffen aus der niederen Tierreihe. Doch sind auch hier die Spektralerscheinungen zum mindesten verwertbar, um einem Pigment eine Sonderstellung oder eine spezifische Natur zuzuerkennen. Man beachte dabei stets die Veränderungen der Absorptionsstreifen bei den durch Alkali oder Säure vermittelten Farbumschlägen und prüfe auf die Wiederkehr des ursprünglichen Spektralbildes nach Neutralisation der Lösung. Liegen Farbstoffe vor, die in keinem der bekannten Lösungsmittel ohne Änderung ihrer chemischen Zusammensetzung löslich sind, so kann man diese Substanzen (Pigmentkörner) als Rückstand gewinnen, indem man vorher Fettsubstanzen durch Alkoholätherextraktion und Proteinsubstanzen durch Zerkochen mit kochenden Säuren oder durch proteolytische Fermente beseitigt und den Pigmentrückstand schließlich gut wäscht. Befindet sich das Pigment nur locker in Gewebslücken enthalten, so kann man dasselbe auch mechanisch herauslösen und dann die Beseitigung der Proteinverunreinigungen in der eben genannten Weise folgen lassen.

Es ist klar, daß bei mangelnden chemischen Kenntnissen über die tierischen Farbstoffe von einer Systematik derselben keine Rede sein kann. Eine Anordnung der hier in Frage stehenden Substanzen nach zoologischen Gesichtspunkten ist den speziellen Lehrbüchern dieser Wissenschaft vorbehalten. Eine Reihenfolge andrerseits, die nur nach dem Gesichtspunkt der Farbennuance gebildet ist, würde keinesfalls glücklich sein, wenn sie auch für die Pigmente der niedersten Tiere kaum zu vermeiden ist. Wir folgen daher einer Anordnung von eher physiologischen Rücksichten und besprechen die Farbstoffe in der Reihenfolge:

A. Farbstoffe in Sekreten und Gewebsflüssigkeiten (Drüsensekrete, Blut, Harn).

B. Farbstoffe in Geweben. In der zweiten Gruppe trennen wir in chemisch besser bekannte Gruppen: 1. Farbstoffe der Hämatinreihe, 2. Verwandte der Gallenfarbstoffe, 3. Farbstoffe der Harnsäuregruppe, 4. Lipochrome und 5. Uranidine. Für den Rest der Substanzen bleibt nur eine Reihenfolge nach Grundfarben, wobei wir die schwarzgefärbten Produkte als Melanine zusammenfassen.

Über das Vorkommen der Farbstoffe in der Tierreihe vgl. die Tabellen bei *v. Fürth* l. c., S. 531 bis 560).

Spezieller Teil.

A. Farbstoffe in Sekreten und Gewebsflüssigkeiten.

I. Farbstoffe in Drüsensekreten.

Bei einzelnen niederen Tieren sind gefärbte Substanzen in spezifischen Drüsensekreten enthalten. Zu erwähnen sind das sogenannte Purpurin, der violette Farbstoff im Drüsensekret mancher Purpurschnecken und das Aplysiopurpurin im Sekret mancher Aplysienarten. Bei beiden Tieren enthält die Drüse ursprünglich ein oder mehrere Chromogene, die durch bestimmte äußere Einflüsse (Licht, Ferment) erst in den Farbstoff übergehen. In beiden Fällen handelt es sich um gelöste Farbstoffe Ein ungelöster schwarzer Farbstoff, das sogenannte Sepia, findet sich im Tintenbeutelsekret mancher Sepienarten. Im Prinzip stellt auch der gelbe oder grüne Farbstoff der Seide (Seidenlipochrom) ein Sekretprodukt dar.

Es ist denkbar, daß auch andere Farbstoffe, die sich in der Haut oder den Integumenten abgelagert finden, das Produkt besonderer Sekretions- oder Exkretionsorgane sind. Wir fassen hier Cur die nach außen sekretorisch abgeschiedenen Farbstoffe zusammen.

1. **Punizin.** Darstellung des Rohfarbstoffes aus dem bereits durch die Lufteinwirkung gefärbten Sekret, z. B. von Murex trunculus (*A.* und *G. de Negri*[1]): Die von der Muschel abgelösten Purpurdrüsen werden zerrieben, der Sonnenbestrahlung ausgesetzt und nach dem Violettwerden eingetrocknet. Der dann feingepulverte Gewebsrückstand wird mit heißem Eisessig behandelt, wobei der Farbstoff in Lösung

[1]) *A.* und *G. de Negri*: Della materia colorante dei Murici e della porpora degli antichi. Atti della R. Università di Genova. **3.** 96 (1875).



geht. Die filtrierte Eisessiglösung wird mit Wasser verdünnt und der sich hierbei abscheidende Farbstoff in Chloroform aufgenommen. Als Verdunstungsrückstand des Chloroforms (bei Zimmertemperatur im Vakuum) hinterbleibt eine metallglänzende, blaurote Masse.

Die Substanz scheint nicht einheitlich zu sein, da ein Teil derselben mit roter Farbe in Äther löslich ist, während ein zweiter ätherunlöslicher Teil von blauer Farbe aus Alkohol kristallisiert erhalten werden kann.

Darstellung aus dem Chromogen von Purpura lapillus (*Schunck*[1]). Die Purpurdrüsen der Schnecke werden im Dunkeln mit Alkohol versetzt und dann erst der Lichtwirkung ausgesetzt. Aus der alkoholischen Lösung scheidet sich hierbei der Purpurfarbstoff ab (etwa aus 400 Schnecken 7 *mg*), der aus heißem oder siedendem Anilin beim Abkühlen in Form von mikroskopischen, purpurfarbigen Sternchen ausfällt. Das Produkt soll einheitlich sein, doch wird diesem Befund von *Letellier*[2]) widersprochen.

Auch die Beobachtung von *Negri* von der Existenz zweier Körper steht hiermit im Widerspruch, steht aber mit der Möglichkeit, zwei differente Chromogene darzustellen, in guter Übereinstimmung.

Darstellung der Chromogene (*Letellier*[3]). Das Farbstoffchromogen befindet sich in dem gelblichweißen Band, das bei Purpura lapillus am Rektum entlang läuft. Einige Hunderte dieser Bänder werden im Vakuum getrocknet und mit Äther extrahiert. Das Ätherextrakt wird mit Kalilauge aufgenommen. Aus dieser Lösung fällt mit Essigsäure ein gelber Farbstoff, der aus Äther in Prismen des triklinen Systems kristallisiert. Zwei andere Chromogene werden dem Gewebe im Dunkeln durch Chloroform oder Petroläther entzogen. Der Rückstand der Extrakte wird immer noch im Dunkeln mit Wasser in eine wasserlösliche aschgraue Substanz und eine schwerer lösliche apfelgrüne Substanz fraktioniert. Beide werden wiederum in Chloroform aufgenommen. Die erstere kristallisiert in orthorhombischen, die letztere in klinorhombischen Prismen. Ihre Trennung gelingt auch durch die fraktionierte Extraktion, da Petroläther leichter die apfelgrüne, Chloroform leichter die aschgraue Substanz aufnimmt.

[1]) *E. Schunck*: Note on the purple of the ancients. Journ. chem. Soc. **35**. 589 (1879); **37**. 613 (1880).

[2]) *A. Letellier*: Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapillus. Arch. de zool. exp. et gén. Notes et revue. (4.) **1**. 25 (1903).

[3]) *A. Letellier*: Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapillus. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **109**. 82 (1890); **111**. 307 (1891); Arch. de zool. exp. **8**. 361 (1889).



Qualitativer Nachweis des Chromogens (*Schunck*). Man erschöpft die Purpurdrüsen der Schnecke im Dunkeln mit Alkohol und Äther. Die gelben Extraktlösungen enthalten das Chromogen, das sich bei der Sonnenbestrahlung erst grün färbt und dann in ein sich abscheidendes purpurfarbenes Pulver verwandelt.

Einige Eigenschaften des Farbstoffes: Löslich in Chloroform, heißem Alkohol, Eisessig, Anilin, Essigsäureanhydrid. Grünfärbung beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure, Blaufärbung beim Verdünnen dieser Lösung mit Wasser. Empfindlichkeit unter Entfärbung gegen Oxydantien. Keine charakteristische Absorptionsstreifen. Über die chemische Natur des Farbstoffes steht nichts Sicheres fest. Diese Eigenschaften sind alle nur wenig gesichert, nachdem *Letellier*[1]) wenigstens für Purpura lapillus die Existenz dreier Pigmente festgestellt hat, von denen das eine gelb und lichtunempfindlich ist, das zweite, tiefgrüne in der Sonne blau und das dritte aschgrau, an der Luft carminrot wird.

Purpurfarbstoff von Murex brandaris ist durch *Friedländer*[2]) als 6.6'-Dibromindigo aufgeklärt.

Darstellung: Die herauspräparierte Drüse der Schnecke wird auf Filtrierpapier gestrichen und durch Sonnenbestrahlung während einer Stunde der Farbstoff entwickelt. Darnach wird die gefärbte Papiermasse durch halbstündiges Erwärmen auf dem Wasserbad mit verdünnter Schwefelsäure (1 : 2) maceriert. Der Brei wird alsdann mit heißem Wasser gewaschen, auf der Nutsche gesammelt und zur Entfernung von Verunreinigungen im *Soxhlet* mit Alkohol erschöpft. Hierauf wird der Farbstoff mit kochendem Benzoesäuretähylester extrahiert, aus welchem er beim Erkalten in flimmernden, kupferglänzenden Kristallen ausfällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Benzoeäther oder Chinolin, wegen der Schwerlöslichkeit am besten durch Extraktion aus einer *Soxhlet*-Hülse, die in dem Kolben unter dem Kühler aufgehängt ist.

Ausbeute 1·4 *g* aus 12.000 Schneckendrüsen.

Die Eigenschaften und die analytischen Zahlen dieses Körpers stimmen vollkommen mit dem 6.6'-Dibromindigo überein. C 45·92, H 2·13, N 6·63, Br. 37·40%, unlöslich in der Mehrzahl[3]) organischer Solvenzien, löslich in der Hitze in Nitrobenzol, Anilin, Benzoesäure, Chinolin, Acetyltetrachlorid. In letzterem Lösungsmittel zeigt er

[1]) *A. Letellier*: Untersuchungen über den Purpur von Purpura lapillus. Arch. de zool. exp. et gén. Notes et revue. (4.) **1**. 25 (1903).

[1]) *P. Friedländer*: Über den antiken Purpur. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 785 (1909); vgl. hierzu Monatsh. f. Chem. **28**. 991 (1907).

[3]) *Fr. Sachs* und *R. Kempf*: Chem. Ber. **36**. 3303 (1903); *Fr. Sachs* und *E. Sichel*: ibid. **37**. 1868 (1904).

bei 120 bis 130° einen Absorptionsstreifen im Orange ($\lambda = 603\ \mu\mu$) allmählich bis $\lambda = 565\ \mu\mu$. Inwieweit bereits *Schunck* den gleichen Körper aus Purpura lapillus in Händen hatte, läßt sich nicht entscheiden. Auch ist es denkbar, daß andere Purpurschneckenarten einen anders zusammengesetzten Farbstoff enthalten. Jedenfalls aber dürfte auch dieser zu den Indigofarbstoffen zählen.

2. **Aplysiopurpurin.** Aplysiopurpurin ist ein purpurroter Farbstoff im Sekret der Mantelranddrüsen und der *Bohat*schen Drüsen von Aplysienarten; das Chromogen des Farbstoffes geht allmählich von kastanienbraunen über blaue, blaurotviolette in gelbbraune Farbentöne über.

An der Farbbildung sind vermutlich Luftsauerstoff und Fermente beteiligt.

Isolierbar ist der blaue Farbstoff durch Ausschütteln der angesäuerten Lösung mit Chloroform und Abdunsten des Chloroforms[1]). Der violette Farbstoff (das Aplysiopurpurin) kann in Alkohol (*Moseley*[2]) oder Wasser aufgenommen werden. Er ist aus alkoholischer Lösung durch Kochsalz (*Ziegler*[3]), aus wässeriger Lösung durch Ammoniumsulfat (*Mc Munn*)[4]) bei Ganzsättigung fällbar.

Das violettrote Sekret der Operculumdrüsen von Aplysia limarina untersuchte *Flury*[5]); er fand es in Alkohol und Äther löslich und mit Ammonsulfat aussalzbar.

Über die chemische Natur dieser Substanz ist bei ihrer Labilität nichts bekannt. Die Zugehörigkeit zu Anilinfarbstoffen ist hypothetisch. Sie zersetzt sich in der Lösung auch im Dunkeln unter Bildung eines ätherlöslichen Aplysiocyanins.

Spektralverhalten: (*Mc Munn-Moseley*) in wässeriger Lösung:

Breites Absorptionsband bei *F*, ein heller Streifen zwischen *D* und *E*, der in großer Verdünnung verdoppelt erscheint. Für das rote Pigment von Aplysia depilans und Aplysia punctata gibt *Briot*[6]) ein anderes Spektralbild an: zwei Absorptionsstreifen, die zwischen *D* und *E* und zwischen *b* und *F* liegen. In saurer, wässeriger

[1]) *A.* und *G. de Negri*: Über die färbende Substanz der Aplysien. Atti della R. Università di Genova. **3.** 11 (1875).

[2]) *H. N. Moseley*: Über Farbstoffe verschiedener Tiere. Quart. Journ. Microsc. Science. **17.** 12 (1877).

[3]) *M. Ziegler*: Bemerkung über das natürliche Anilin. Bull. de la Soc. industrielle de Mulhouse. **37.** 283 (1887); Journ. f. prakt. Chem. **103.** 63 (1868).

[4]) *C. H. Mc Munn*: Die Pigmente von Aplysia puctata. Journ. of Phys. **24.** 1 (1899).

[5]) *Ferd. Flury*: Arch. f. exper. Path. u. Ther. **79.** 250 (1918).

[6]) *A. Briot*: Über das rote Sekret der Aplysien. Compt. rend. soc. biol. **56.** 899 (1904).

Lösung ist der erste Streifen nach *E* verbreitert, der zweite Streifen unverändert, in ammoniakalischer Lösung besteht nur ein Streifen[1]).

Das Farbenspiel des natürlichen Sekretes erinnert an die interessanten Beobachtungen von *Abderhalden* und *Guggenheim*[2]) über die Färbungen von tyrosinhaltigen Polypeptiden durch Tyrosinaseferment. Auch dort sind schöne Farben beobachtet. Es wäre denkbar, daß sich auch in den Aplysiensekreten solche Polypeptide vorfinden, deren Färbung durch Fermente des Sekretes hervorgerufen würden. Jedenfalls ist hier auffallend, daß die Farbenveränderung nicht durch Licht oder Luft bedingt ist, da die Umsetzung auch bei Ausschluß derselben fortschreitet.

3. **Sepiaschwarz** im Tintensekret der Cephalopoden (z. B. Octopus vulgaris). Der als Sepia bezeichnete schwarz-Farbstoff, der vermutlich durch einen Fermentvorgang (tyrosinasee ähnliches Ferment) aus einem uugefärbten Chromogen (vermutlich ein tyrosinhaltiges komplexes Eiweißderivat) entsteht, findet sich in Form feinster Pigmentkörnchen ungelöst im Tintenbeutelsekret.

Darstellung: Die ein Filter leicht passierenden Körnchen werden durch Aufkochen unter Zusatz einiger Tropfen Kalilauge filtrierbar gemacht (vielleicht geht hierbei schon eine chemische Veränderung vor sich). Das abgesetzte Pigment bleibt dann tagelang unter verdünnter KOH und verdünnter HCl stehen und wird dann mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Nach *Girod*[3]) behandelt man der Reihe nach mit Alkohol, Äther, Wasser, Eisessig, verdünnter Kaliumcarbonatlösung, verdünnter Salzsäure und zuletzt warmem Wasser. Der Rückstand wird zuletzt getrocknet.

Nencki und *Sieber*[4]) behandeln das Tintenbeutelsekret oder die getrockneten, fein zermahlenen Tintenbeutel mit 10%iger Kalilauge bei Wasserbadtemperatur. Das in Lösung gehende Pigment (Sepiasäure) ist ein Umwandlungsprodukt des Sepiaschwarz und wird durch Umfällen mit Säure aus alkalischer Lösung in NaOH, später in NH_3 gereinigt und zur Abscheidung gebracht (vgl. hierzu den Abschnitt: Melanine, S. 778, wo sich eine Kritik dieser Methoden findet).

---

[1]) Vgl. ferner *Paladino*: Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **11**. 65 (1908).

[2]) *E. Abderhalden* und *M. Guggenheim*: Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus Russula delica auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide und einige andere Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**. 331 (1907).

[3]) *P. Girod*: Chemische Untersuchungen über das Sekretionsprodukt des Tintenbeutels bei den Cephalopoden. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **93**. 96 (1881); **101**. 1372 (1885).

[4]) *M. Nencki* und *N. Sieber*: Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. **24**. 21 (1887).

Zusammensetzung nach *Girod*: C 53·6, H 4·02, N 8·6%, *Nencki* und *Sieber*: C 56·36, H 3·56, N 12·21, S 0·51%. Nach *Piettre*[1]) gewinnt man Sepiamelanin durch 24stündige Maceration der Taschen des Tintenfisches mit 6%igem wässerigem Ammoniak; dann werden die Hüllen abgezogen, der schwarze Inhalt wird pulverisiert, zuerst mit verdünntem Ammoniak, dann bis zur Neutralität mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Zusammensetzung: C 58, H 3·39, N 11·29, S 0·42%.

Aus diesem Melanin gewann *Piettre* einen in Alkali löslichen „Pigmentkern".

4. **Lipochrome** der Seide (vgl. bei Lipochrome, S. 772). Ein grüner Farbstoff der Seide von Antherea, Yama-Mai und Rhodia fugax[2]) geht in Alkohol über, und kristallisiert aus Alkohol in blauer, aus Wasser in grüner Farbe. Das Spektrum in alkoholischer Lösung gleicht jenem des Chlorophylls, verschwindet aber mit Alkalien und Schwefelammonium (*Villard*[2]).

II. Farbstoff im Blut.

Hämoglobin und seine Derivate sind in einem besonderen Kapitel besprochen.

Im Blut niederer Tiere finden sich außer dem mit dem Warmblüterhämoglobin identischen Hämoglobin einige gefärbte Substanzen, die nicht der Gruppe der Hämatinderivate angehören, vielmehr, soweit unsere Kenntnisse reichen, chemisch eigenartige Substanzen darstellen. Zu erwähnen wären ein Echinochrom gewisser Echinodermen, ein Chlorocruorin im Blut von Anneliden (Siphonostoma), ein Hämerythrin einiger Sipunculusarten, das Hämocyanin gewisser Mollusken und Crustaceen, das Hämorrhodin der Aplysia depilans, das Tetronerythrin bei höher organisierten Crustaceen, die Melanosen in der Körperflüssigkeit der Insekten und die Lipochrome im Blutserum der Warmblüter.

Einzelne dieser Körper erwiesen sich bei genauerer Untersuchung als schwermetallhaltige Eiweißkörper, die zwar die Fähigkeit der Sauerstoffbindung wie das Hämoglobin besitzen, aber nur zum Teil einen dem Hämoglobin oder Hämatin ähnlichen Aufbau aus einem metallhaltigen Chromogen und einer globinähnlichen Eiweißkomponente aufweisen.

---

[1]) *Maurice Piettre*: Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **153**. 782 und 1037 (1911); **155**. 594 (1912).

[2]) *J. Villard*: Über das angebliche Chlorophyll der Seide. Compt. rend. soc. biol. **56**. 1034 (1904); Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **139**. 165 (1904).

Die Darstellung dieser Körper ist eine relativ leichte und erfolgreiche. Ihre Besprechung sei daher vorangestellt.

1. **Hämocyanin** aus dem Blut von Mollusken (z. B. Octopus) ist der Träger der blauen Farbe im arteriellen Molluskenblut. Über die technischen Einzelheiten zur Gewinnung von Octopusblut vgl. bei *v. Uexküll*[1]).

Darstellung aus arteriellem Octopusblut (*Griffiths*[2]): Man fängt das Blut durch Anschneiden des arteriellen Gefäßes auf und zentrifugiert scharf ab. Das Blut wird alsdann mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung gefällt. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung gewaschen, hierauf in Wasser gelöst und entweder durch Alkohol oder durch Koagulation (Koagulationstemperatur 68 bis 78°) gefällt. Nach *Henze* fällt man das Hämocyanin nach Verdünnen des zentrifugierten und filtrierten Blutes mit Wasser durch Alkohol und gleichzeitiges Erwärmen. Durch mehrfaches Dekantieren wird der fein verteilte Niederschlag gewaschen und auf einem Seidenfilter mit Wasser, Alkohol und Äther behandelt.

Der Körper ist einheitlich, da er das einzige Blutprotein des Tieres ist.

Darstellung in kristallisierter Form (*Henze*[3]). Das zentrifugierte klare Octopusblut wird mit so viel gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, daß eben eine Niederschlagstrübung eintritt; diese wird eben wieder durch Wasserzusatz gelöst. Durch Zusatz von wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure wird eine neue Trübung erzeugt. Nach halbtägigem Stehen hat sich ein Kristallbrei zu Boden gesetzt, der auf einem Seidenfilter gesammelt und mit einer Lösung von 7 Teilen Wasser und 3 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen wird. Will man analysenreine Präparate, so löst man die Kristalle in der eben ausreichenden Menge Wasser, dialysiert gegen destilliertes Wasser bis zur Schwefelsäurefreiheit und koaguliert die Lösung (meist 3·36%) durch Erwärmen auf 70° aus. Hierauf reinigt und trocknet man mit Wasser, Alkohol und Äther.

Elementarzusammensetzung: C 53·66, H 7·33, N 16·09, S 0·86, Cu 0·38%, Koagulationstemperatur 68 bis 70° in 1·5%iger salzfreier Lösung.

---

[1]) *L. Frédericq*: Recherches sur la physiologie de poulpe commun. Arch. de Zool. expér. **535.** (1878); vgl. auch hierzu Biochem. Zeitschr. **19.** 393 (1909). Vgl. bei *J. Hyde*: Beobachtungen über die Sekretion der sogenannten Speicheldrüse von Octopus. Zeitschr. f. Biol. **35.** 459; vgl. S. 717, Nr. 1. S. 279 und 62.

[2]) *A. B. Griffiths*: Über die Zusammensetzung des Hämocyanins. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **114.** 496 (1892).

[3]) *M. Henze*: Zur Kenntnis des Hämocyanins. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33.** 370 (1901); desgl. II. Zeitschr. f. physiol. Chem. **43.** 290 (1904).

Der Körper, der durch ein hohes Sauerstoffbindungsvermögen ausgezeichnet ist (gemessen nur am Octopusblut, *Griffiths*[1]) enthält Kupfer in lockerer Bindung, ähnlich wie die Metallalbuminate. Dasselbe wird durch verdünnte Säuren leicht abgespalten und ist durch Ferrocyankali dann nachweisbar. Der zurückbleibende Körper stellt ein Acidalbuminat dar (C 53·01, H 7·64, N 16·04%). Das Hämocyanin hat keine dem Hämoglobin ähnliche Konfiguration, da die Abspaltung einer hämatinhaltigen Komponente nicht erfolgt. Aus dem Blute von Helix pomatia gewann *Philippi*[2]) ein Hämocyanin mit 10% Cu, das intensive Pyrrholreaktion zeigte. Nach *Dhéré* und *Schneider*[3]) bildet das Hämocyanin der Schnecke mit NO einen kristallisierenden grünen Farbstoff „Stickoxydhämocyanin".

2. **Hämocyanin** aus Crustaceenblut findet sich neben einem roten Farbstoff (Tetronerythrin siehe unten) und anderen farblosen Proteinen im Blut höherer Crustaceen. Es ist nur bei einigen Gliedern dieser Tierklasse vorhanden (Homarus maja, Portucuco u. a.).

Darstellung: *Halliburton*[4]). Man versetzt das sauerstoffgesättigte Blut mit Magnesiumsulfat oder Natriumchlorid zu Ganzsättigung und unterstützt die nur langsam erfolgende Aussalzung durch 12 bis 36 Stunden dauerndes Schütteln. Es entsteht eine Fällung (quantitativ nur durch $Mg\,SO_4$), die man auf dem Filter mit gesättigter $Mg\,SO_4$-Lösung wäscht und in Wasser wieder löst. Eine Abscheidung erfolgt dann durch Koagulation bei 65 bis 70°. Zur vollkommenen Abscheidung ist mehrstündiges Erwärmen auf diese Temperatur nötig.

Die an der Luft blaue Substanz ist, wie das Hämocyanin der Mollusken, ein metallalbuminatähnlicher Körper. Die Einheitlichkeit des so dargestellten Körpers ist nicht gesichert. Da der Körper durch Dialyse, Wasserverdünnung und CO_2-Sättigung seiner Lösung und auch durch verdünnte Essigsäure gefällt wird, scheint er Globulincharakter zu besitzen, vorausgesetzt, daß er nicht einem fremden Globulin nur beigemischt ist, und diese Möglichkeit ist noch nicht im negativen Sinne entschieden. Das Sauerstoffbindungsvermögen, gemessen an der Leichtigkeit der Sauerstoffabgabe durch reduzierende Mittel, scheint ein von Spezies zu Spezies verschiedenes.

---

[1]) *A. B. Griffiths*: Über das Blut der Avertebraten. Proc. roy. soc. of Edinburgh. **18.** 288 (1890).

[2]) *Ernst Philippi*: Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien. 2. Juli **1914**; derselbe: Zeitschr. f. physiol. Chem. **104.** 88 (1918).

[3]) *Ch. Dhéré* und *A. Schneider*: Compt. rend. Soc. de biol. **82.** 1041 (1919).

[4]) *W. D. Halliburton*: Über das Blut von decapoden Crustaceen. Journ. of phys. **6.** 300 (1885).

Die Identität mit Molluskenhämocyanin ist nicht sicher, eine Entscheidung wird erst möglich, wenn eine Reindarstellung des Crustaceenhämocyanins gelungen ist.

Dhéré und *Burdel*[1]) fanden bei spektroskopischer Prüfung von Lösungen des Hämocyanins und des Tetronerythrins (s. d.) bei alkalischer Reaktion ein charakteristisches Oxyhämocyaninband bei λ 571 bis 581 μ: Beide Substanzen sind sowohl im Mollusken- wie im Crustaceenblut vorhanden.

Die folgenden gefärbten eiweißhaltigen Substanzen haben gleichfalls die Fähigkeit der Sauerstoffbindung, haben also biologisch respiratorische Pigmentfunktion. Sie sind bisher nicht mit Sicherheit rein dargestellt. Durch die Analyse der Spektroskopie aber ist ihre Verwandtschaft mit dem klassischen Hämatinkomplex sehr wahrscheinlich gemacht.

3. **Echinochrom** findet sich in den Zellelementen der Perivisceralflüssigkeit gewisser Echinodermen (u. a. Sphaerechinus sphaera) [*Mc Munn*[2]), *Griffiths*[3])]. Zur Darstellung bereitet man ein Extrakt des die gefärbten Zellen einschließenden, vorher getrockneten Blutgerinnsels mit Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform oder Benzin oder Schwefelkohlenstoff. Eine Analyse des amorphen Abdampfrückstandes aus Chloroform, Benzin oder Schwefelkohlenstoffextrakten führt zu der bis jetzt unbewiesenen Formel

$$C_{12}{}^{0}\,H^{00}\,N_{12}\,Fe\,S_{2}.O_{12}.$$

Das Spektralverhalten wechselt mit dem Lösungsmittel. Durch Kochen mit Mineralsäuren soll das Spektrum des Hämochromogens bzw. Hämatoporphyrins entstehen. Eine respiratorische Funktion kommt dem Farbstoff nicht zu (*Winterstein*[4]).

Nach *Mc Clendon*[5]) wird das in den Elaeocyten, den Wanderzellen der Körperflüssigkeit von Arbacia punctata, vorhandene Echinochrom wie folgt dargestellt: Man läßt die Körperflüssigkeit gerinnen, bringt die so gewonnenen Elaeocytenin Aceton, filtriert den Extrakt, dampft ein, wäscht den Rückstand mit CCl_4, dann wiederholt man die Lösung in Aceton, löst schließlich in Äther, filtriert und dunstet diese letzte Lösung ein. Die amphotere, mit

---

[1]) *Ch. Dhéré* und *A. Burdel*: Journ. de Physiol. et de Path. gén. **18**. 685 (1920); vgl. ferner *G. Quagliariello*: Arch. di science. biol. **1**. 246 (1920).

[2]) *C. A. McMunn*: Über die Färbung des Blutes einiger Avertebraten. Quart. Journ. of microsc. Science. **25**. 469 (1885).

[3]) *A. B. Griffiths*: Über Echinochrom, ein respiratorisches Pigment. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **115**. 419 (1892).

[4]) *H. Winterstein*: Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Biochem. Zeitschr. **19**. 348 (1909).

[5]) *J. F. Mc Clendon*: Journ. of biol. Chem. **11**. 435 (1912).

Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure fällbare Substanz gab bei der Analyse die Werte C 51, H 7·7%.

4. **Chlorocruorin** ist ein grüner Farbstoff, der aus dem Blut mancher Anneliden gewonnen werden kann (u. a. Siphonostoma, Spirographis Spallanzani, Sabellaarten), *Lancester*[1]), *Griffiths*[2]).

Man fällt das Blut z. B. von Sabella mit Alkohol. Die entstehende Fällung löst man in einer verdünnten Lösung von $Mg\,SO_4$. Durch Sättigen mit $Mg\,SO_4$ erhält man einen gefärbten Niederschlag, der auf dem Filter mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen wird. Die Lösung des Filterrückstandes in Wasser wird durch Erwärmen auf 56 bis 57° koaguliert. Das grün gefärbte Filtrat dieser Proteinkoagulate wird mit Alkohol gefällt. Der entstandene Niederschlag wird mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Elementarzusammensetzung: C 54·25, H 6·82, N 16·16, Fe 0·45, S 0·78%. Die Reinheit des Körpers ist durch diese Darstellungsmethode nicht garantiert. Der Körper hat wie das Hämoglobin ein Sauerstoffbindungsvermögen und zeigt in wässeriger Lösung spezifische Absorptionsstreifen eines Chlorocruorins und eines Oxychlorocruorins:

Oxychlorocruorin: Ein Streifen zwischen *C* und *D* (λ 618 bis 598), ein zweiter Streifen zwischen *D* und *E* (λ 576 bis 584,) in ihrer Lage nicht mit den Streifen des Oxyhämoglobins übereinstimmend.

Durch vorsichtige Reduktion entsteht ein Streifen des Chlorocruorins, entsprechend den oben genannten dunkleren Streifen zwischen *C* und *D*. Durch vorsichtige weitere Reduktion entsteht anscheinend ein reduziertes Chlorocruorin (*Lancester*), durch noch weitere Reduktion mit Schwefelammonium erscheinen schließlich die Absorptionsstreifen des reduzierten Hämatins.

In Analogie zu diesen qualitativen Proben stehen die Beobachtungen (*Griffiths*), daß Chlorocruorin durch Einwirkung von Säuren oder Alkalien in Eiweiß, Hämatin und Fettsäuren gespalten wird.

5. **Pinnaglobin** im Blut von Pinna squamosa (*Griffiths*[3]): Das defibrinierte Blut wird mit Alkohol gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wird in verdünnter Magnesiumsulfatlösung gelöst und durch Sättigen mit $Mg\,SO_4$ wieder ausgefällt. Der neue Niederschlag wird auf dem Filter mit gesättigter Salzlösung gewaschen, in Wasser

---

[1]) *R. Lancester*: Journ. of Anat. u. Phys. **2**. 114 (1867); ibid. **3**. 119 (1870); vor allem **4**. 119 (1869).

[2]) *A. B. Griffiths*: Über die Zusammensetzung des Chlorocruorins. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **114**. 1277 (1892).

[3]) *A. B. Griffiths*: Über die Zusammensetzung von Pinnaglobin, ein neues Globulin. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **114**. 840 (1892).

gelöst und durch Erhitzen der Lösung auf 56° von Albuminstoffen befreit. Das in Lösung befindliche Globulin des Filtrates wird zur Reinigung mit Alkohol gefällt, mit Wasser gewaschen und bei 60° dann im Vakuum getrocknet. Das Pinnaglobulin, das im Blut in farbloser Vorstufe vorhanden ist und erst durch die Sauerstoffbindung an der Luft in ein bräunliches Pigment übergeht, ist wie das Hämocyanin ein respiratorisches Pigment. Es enthält als Metallkomponente Mangan.

Elementare Zusammensetzung: C 55·7, H 6·24, N 16·24, S 0·81, Mn 0·35, O 21·29%.

Ähnliche respiratorische Globuline finden sich im Blut von Gastropoden: Patella vulgata, Chiton, Doris und verschiedenen Tunicaten [letztere als γ-Achroglobine[1]) bezeichnet]. Diese respiratorischen Substanzen sind ungefärbt und metallfrei. Ihre Darstellung erfolgt nach der für Pinnaglobulin angegebenen Methode. Die Achroglobine sind manganfrei. Die Existenz solcher Körper ist bis jetzt unbewiesen.

6. **Hämerythrin** ist ein roter Farbstoff in den Blutkörperchen und der perienterischen Flüssigkeit mancher Würmer (Sipunculus nudus, Sipunculus Gauldii, Phascolosoma). Seine Darstellung versuchte *Griffiths*[2]) nach dem für Chlorocruorin mitgeteilten Verfahren.

Nach *Cuenot*[3]) stellt man das Hämerythrin aus der Cölomflüssigkeit weiblicher Exemplare von Sipunculus nudus dar, indem man sedimentiert, nach dem Absitzen der Eier abpipettiert, zentrifugiert und das Serum sorgfältig abtrennt. Die braune Schicht der Blutkörperchen wird in wenig destilliertem Wasser gelöst, und die Formelemente werden durch wiederholtes Zentrifugieren entfernt. Beim Verdunsten im Vakuum erhält man das Hämerythrin (nicht kristallisiert) relativ rein.

Der Körper kann qualitativ leicht nachgewiesen werden, da er durch Verreiben der Blutzellen (die sich aus dem spontan gerinnenden Blut oder der perienterischen Flüssigkeit als obere Schicht absetzen) mit Wasser in Lösung geht.

Der Körper ist eisenhaltig und schwefelhaltig, gibt aber kein charakteristisches Absorptionsspektrum. Der Körper hat jedenfalls ein hohes Sauerstoffbindungsvermögen, so daß er Oxyhämoglobin zu reduzieren vermag (*Krukenberg*).

[1]) *Griffiths*: Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **115**. 359, 474, 738 (1892); **116**. 1206 (1893).

[2]) *A. B. Griffiths*: Das Hämerythrin, ein respiratorisches Pigment im Blut gewisser Würmer. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **115**. 669 (1892).

[3]) *Cuenot*: Station zool. d'Arcachon. Trav. de Labor. Paris. **1900/02**. S. 112.

7. **Tetronerythrin** ist ein roter Farbstoff, der sich in wechselnder Menge im hämocyaninhaltigen Blut höherer Crustaceen vorfindet.

D a r s t e l l u n g a u s K r a b b e n b l u t (*Halliburton*[1]).

Man fängt das Blut frisch auf und versetzt es zu maximaler Fällung mit Alkohol. Das rot gefärbte Filtrat der Eiweißfällung wird eingedampft, wobei sich der Farbstoff flockig abscheidet. Derselbe wird in Alkohol oder Äther gelöst und nach dem für Lipochrome gültigen Verfahren (vgl. S. 772 ff.) gereinigt.

Der Körper zeigt vollständig die Eigenschaften der Lipochrome und Tetronerythrine anderer Provenienz (vgl. daher bei Lipochromen S. 772 ff.).

Der Körper hat, soweit bis jetzt bekannt, keine respiratorische Pigmentfunktion. Er ist bei Crustaceen außer im Blut auch im Skelett und der Hypodermis enthalten (siehe Crustaceorubin S. 774 und Hämocyanin S. 740).

8. **Melanosen** im Blut und der Hämolymphe von Insekten sind Chromogene, die unter dem Einfluß tyrosinaseähnlicher Fermente in dunkel bis schwarz gefärbte Pigmente übergehen. Über ihre chemische Natur ist nichts Sicheres bekannt (*v. Fürth*). Vermutlich handelt es sich um komplexe, Tyrosin oder zum mindesten aromatische Kerne enthaltende Eiweißderivate.

9. Über die Farbstoffe im Warmblüterblut (Hämoglobin usw.) und über Lipochrome s. S. 772.

III. Farbstoffe von unbekannter Zusammensetzung im Harn.

Im normalen und pathologischen Harn kommen mehrere Farbstoffe vor. Bekannt, isoliert und eingehender studiert sind: das U r o c h r o m, das U r o r o s e i n, das U r o r o e r y t h r i n und schließlich das U r o b i l i n.

Keiner dieser Farbstoffe ist bis jetzt in sicher analysenreinem Zustand isoliert, von keinem ist die Konstitution oder chemische Gruppenzugehörigkeit aufgeklärt. Außer einigen Versuchen, das Urobilin als ein Derivat der Gallenfarbstoffe zu erklären, herrscht noch vollständige Unsicherheit über die physiologische Genese dieser Substanzen.

Die D a r s t e l l u n g dieser Farbstoffe erfolgt mit Hilfe geeigneter Extraktionsmittel aus dem Harn bzw. der eingeengten Harnflüssigkeit oder durch Extraktion von künstlich erzeugten, den Farbstoff adsorbierenden Salzfällungen.

Die Identifikation und der qualitative Nachweis geschieht durch charakteristische Farbenreaktionen, Farbeneigenschaften und

[1]) *W. D. Halliburton*: Journ. of phys. **6**. 300 (1885); l. c S. 725, Note 3.



Farbumwandlungen der Salze und Spektralerscheinungen der Farbstofflösungen in organischen Solvenzien. Da die verschiedenen Methoden der Isolierung keineswegs zu konstant zusammengesetzten Körpern führen, da andrerseits auch nur die Elementarzusammensetzung bis jetzt ein Kriterium der Reinheit und Einheitlichkeit der fraglichen Substanzen darstellt, so müssen wir in diesem Zusammenhang eine Mehrzahl von Darstellungsmethoden mitteilen.

Zur Farbstoffanalyse des Harnes gibt *M. Weiss*[1]) folgendes Schema:

I. Fraktion der roten Farbstoffe (Urobilinfraktion); diese fällt bei Zusatz von 5 *g* neutralem Bleiacetat auf 100 cm^3 unvergorenen Harn (bei pathologischen Harnen sind bis zu 10 *g* anzuwenden).

II. Fraktion der gelben Farbstoffe (Urochromfraktion) fällt aus dem Filtrat von I bei tropfenweisem Zusatz von 10%iger Lauge. Die Bleiverbindungen des Urochroms und des Urochromogens sind leichtlöslich in Essigsäure.

III. Fraktion der ungefärbten Proteinsäuren (Histidinfraktion); diese enthält die Substanzen, die Diazoreaktion nach *Pauly* zeigen.

1. **Urochrom** ist der Farbstoff des normalen und pathologischen Harnes. Normale Menge etwa 0·15%.

Darstellungsmethode nach *Garrod*[2]). Größere Harnmengen werden in Portionen von zirka je 1 *l* mäßig erwärmt und mit fein gepulvertem festen Ammonsulfat gesättigt. Zu der klar filtrierten Flüssigkeit setzt man ein Fünftel ihres Volums absoluten Alkohol. Hierbei scheidet sich eine alkoholisch wässerige Schicht ab, welche den Farbstoff enthält. Diese wird in viel kaltes Wasser eingegossen. Die entstehende Lösung wird abermals mit Ammonsulfat gesättigt. Es scheidet sich wiederum eine alkoholische Farbstofflösung ab, die man durch Aufgießen auf festes Ammonsulfat in einem Standgefäß bei gelinder Wärme entwässert. Die überstehende alkoholische Lösung wird hierauf abgetrennt und bei alkalischer Reaktion unter häufigem Zusatz von Ammoniak auf dem Wasserbad eingetrocknet. Der braune Abdampfrückstand, der noch Ammonsulfat und Indoxylschwefelsäure enthält, wird ein- bis zweimal mit Essigäther gewaschen (Indikanbeseitigung) und dann längere Zeit unter absolutem Alkohol belassen. Die schön gelb gefärbte Alkohollösung wird bis zur Orangefärbung eingeengt und mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Der flockig abgeschiedene Farbstoff wird auf dem Filter mit Äther gewaschen,

---

[1]) *Moriz Weiss*: Biochem. Zeitschr. **102**. 228 (1913); **112**. 61 (1920).

[2]) *A. E. Garrod*: Beitrag zum Studium des gelben Farbstoffes des Urins. Proc. of the Roy. Soc. **55**. 394 (1894).

getrocknet und nochmals mit Chloroform und Äther extrahiert. Das Urochrom hinterbleibt als eine amorphe braune Substanz.

Methode nach *Thudichum*[1]).

Man fällt aus dem Harn durch Zusatz von Ätzbaryt und Bariumacetat die Salze und die etwa beigemengten Blutfarbstoffe. In dem Filtrat fällt man nach 24 Stunden das Urochrom und Indoxyl mit Bleiacetat und Ammoniak.

Den entstehenden Bleiniederschlag wäscht man auf dem Filter gut aus und zerreibt ihn mit verdünnter Schwefelsäure. Das Filtrat des Barium- und Bleisulfates wird mit Bariumcarbonat von überschüssiger Schwefelsäure befreit, abermals filtriert und mit Kohlensäure von Baryt befreit. Das gefärbte Filtrat wird nun mit festem essigsauren Quecksilberoxyd versetzt. Der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter mit heißem Wasser gewaschen. Die gelb gefärbte Quecksilberfällung wird, in Wasser fein verteilt, mit H_2S von Quecksilber befreit. Die gelbe, durch einen Luftstrom von H_2S befreite Lösung, welche noch Spuren von Essigsäure und Salzen enthält, wird mit frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird mit H_2S von Silber befreit und eingedunstet. Es hinterbleibt ein Urochrom in Form einer festen, gelben Substanz zurück, das anscheinend von der Substanz von *Garrod* verschieden ist.

Methode von *Schunck*[2]).

Man fällt den Harn maximal mit Bleizucker, das gefärbte Filtrat wird mit Bleiessig gefällt und auf dem Filter gut gewaschen. Hierauf zerlegt man den Niederschlag unter Wasser mit Schwefelwasserstoff und dampft das gefärbte Filtrat des Schwefelbleies zur Trockne. Der Abdampfrückstand wird mit absolutem Alkohol extrahiert und nach der Methode von *Garrod* mit Äther gefällt. Auch dieses ätherunlösliche Urochrom ist von der *Garrod*schen Substanz verschieden. Ein Teil bleibt ätherlöslich.

Methode nach *Bondzynski*, *Dombrowski* und *Panek*[3]).

Bei der Darstellung der Alloxyproteinsäure wird ein Urochrom gewonnen. Als Ausgangsmaterial dienen die Gemenge von Calciumsalzen der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe. Die chlorfreien Salze werden in Wasser und Essigsäure zu neutraler Reaktion gelöst und mit einer Kupferacetatlösung versetzt. Der entstehende reichliche Niederschlag wird nach einiger Zeit auf dem Filter ge-

[1]) *J. L. W. Thudichum*: Chemische Studien über den Harnfarbstoff. Brit. med. Journ. S. 509 (1864); Journ. f. prakt. Chem. **104**. 257 (1868).

[2]) *Schunck*: vgl. *Huppert-Neubauer*: Analyse des Harnes. 10. Aufl. S. 509. Original: Proc. roy. soc. **16**. 85 (1867).

[3]) *A. Bondzynski, H. Dombrowski* und *K. Panek*: Über die Gruppe von im normalen Menschenharn enthaltenen Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 83 (115) (1905).

sammelt, mit Schwefelwasserstoff alsdann in der Wärme bei 45° zerlegt. Es entstehen braunrot gefärbte Lösungen des Urochroms. Die Identität dieses Körpers mit dem klassischen Urochrom steht noch nicht fest.

D a r s t e l l u n g n a c h *Dombrowski*[1]) als Silbersalz.

Aus dem Harn werden Schwefelsäure, Phosphorsäure und Harnsäure zunächst mit ammoniakalischem Barium- und Calciumacetat gefällt. Auf 10 *l* Harn 86 *g* Ca-Acetat + 53 *g* Ba-Acetat + 43 cm^3 21% NH_3. Die Flüssigkeit wird mit Essigsäure neutralisiert und filtriert, aus dem schwach angesäuerten Filtrat wird das Urochrom mit Kupferacetat gefällt. Der graugrüne Niederschlag wird nach 24 Stunden auf dem Saugfilter gesammelt, gut gewaschen und in Wasser fein verteilt mit H_2S entkupfert. Nach Entfernung des H_2-S-Überschusses durch Vakuumdestillation in einer CO_2-Atmosphäre bei gelindem Erwärmen wird die gelblichrote Flüssigkeit mit einem geringen Überschuß von Baryt gefällt. Das Filtrat des geringen gelben Niederschlages wird durch CO_2 von Barium befreit, im Vakuum zum Sirup eingedickt und mit starkem Alkohol ausgefällt. Die Fällung wird alsdann in Wasser gelöst durch Zusatz von Natriumsulfat (ohne Überschuß) in das Natriumsalz verwandelt; die Lösung dieses Salzes wird im Vakuum eingeengt und durch Zusatz von Silbernitrat von Chlor befreit. Aus dem Filtrat des Chlorsilbers wird das Silbersalz des Urochroms durch Zusatz von Alkohol und einem Überschuß von konzentrierter Silbernitratlösung gefällt. Das Salz wird zur Entfernung von Nitrat in Wasser gelöst und mit starkem Alkohol gefällt.

M e t h o d e v o n *Hohlweg*[2]).

Die Methode hat den Vorzug, den Farbstoff ohne Einwirkung chemischer Agenzien durch Adsorption anzureichern, sie führt jedoch bis jetzt nur zu einem Rohurochrom, das aber einer weiteren Verarbeitung für etwaige Konstitutionsnachweise sehr zugänglich ist.

Der eingeengte Harn oder das saure Filtrat des vorher bei ammoniakalischer Lösung mit Barium- und Calciumacetat ausgefällten und von Baryt mit CO_2 befreiten Harnes filtriert in langsamem Strom durch eine Schicht von Tierkohle, die sich in 5 *cm* breiten, 5 *cm* langen Glasröhren befindet. Wenn die Tierkohle mit adsorbiertem Farbstoff gesättigt ist, was an den farbig abtropfenden Filtraten erkenntlich ist, wird sie herausgenommen, getrocknet

[1]) *St. Dombrowski*: Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffes des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**. 188 (1907); vgl. auch *H. Liebermann*: Über die Gruppe schwefel- und stickstoffhaltiger Säuren im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**. 129 (1907).

[2]) *H. Hohlweg*: Zur Kenntnis des Urochroms. Biochem. Zeitschr. **13**. 198 (1908); vgl. ibid. **13**. 205, 208 (1908).



und in neuen Rohren mit Eisessig extrahiert. Das strohgelbe bis braunrote Extrakt wird im Vakuum bei 40° eingeengt und zu nahezu vollständiger Entfernung des Eisessigs zum Sirup eingedickt. Der Sirup wird dann mit wenig Wasser dickflüssig angerührt und mit dem zehnfachen Volumen Äther gefällt. Es bildet sich bei Verwendung größerer Massen eine harzige Masse — der überstehende Äther ist meist ungefärbt —, die nach zwölf Stunden erstarrt und bei 40° getrocknet wird.

Aus 25 *l* unverdünnten Harnes werden etwa 3·1 *g* trockene Substanz dieses Rohurochroms gewonnen.

Dieser Methode im Prinzip ähnlich ist diejenige von *Mellanby* und *Thomas*[1]), die das Urochrom durch Schütteln mit Tierkohle (30 *g* auf 1 *l* Harn) adsorbieren. Die Tierkohle wird mit warmem Wasser gewaschen und sodann mit 50%igem Alkohol, der 5% Na OH enthält, in der Hitze extrahiert. Das Extrakt wird mit Schwefelsäure neutralisiert, der Alkohol abdestilliert, der Destillationsrückstand eingeengt und das Na_2SO_4 auskristallisiert. Nach abermaligem Einengen wird der Farbstoff mit absolutem Alkohol ausgefällt. Er stellt ein braunes Pulver dar, besitzt keine charakteristischen Absorptionsstreifen, dialysiert langsam durch Pergament und zeigt keine Gallenfarbstoffreaktionen.

Zur Darstellung von Derivaten, Salzen oder Bromsubstitutionsprodukten ist eine wässerige Lösung des sirupösen Rückstandes der Eisessigextrakte direkt verwertbar.

Die nach verschiedenen Methoden dargestellten Farbstoffe zeigen keine übereinstimmenden Eigenschaften. Das Präparat nach *Garrod* und *Hohlweg* ist unlöslich in Alkohol, Amylalkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, Ligroin, Äther und Essigäther.

Mischungen von Äther oder Chloroform mit Alkohol lösen.

Fällungsmittel sind: Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure.

Die wässerige Lösung zeigt keine Absorptionsstreifen.

Als einigermaßen bezeichnende Probe gilt das Auftreten einer starken, grünlichen Fluorescenz nach Versetzen einer Urochromlösung mit reinem Acetaldehyd, kurzem Erwärmen und nachfolgendem Chlorzinkammoniak. Die Fluorescenz wird nach 48 Stunde besonders deutlich.

Ein für Harnurobilin (s. d.) charakteristischer Absorptions streifen im Blau entsteht hierbei nicht.

Die Derivate verschiedener Urochrome, wie das Uromelanin[2]), Uropittin (*Thudichum*) oder das Urianin bzw. Urian (*Schunck*)

[1]) *J. Mellanby* und *C. J. Thomas*: Journ. of Physiol. **53**. 96 (1920).
[2]) Vgl. dazu *F. Herzog* und *H. Zeller*: Biochem. Zeitschr. **96**. 233 (1919).

sind so wenig eingehend untersucht, daß auf ihre Besprechung verzichtet werden darf.

Für ein Urochromkupfer ergab sich die Elementarzusammensetzung:

C 36·76, H 3·56, N 9·72, S 2·57, Cu 20·10% (*Dombrowski* usw.);

für ein Ca-Salz:

C 40·39, H 4·85, N 9·02, Asche 4·86, Ca 6·88 (*Salomonson*);

für das freie Urochrom aus einem Silbersalz:

C 43·1, H 5·1, N 11·1, S 5·1, O 35·5%.

Das „Lactochrom", das gelbe Pigment der Milchmolke, soll — nach *Blyth*[1]) dargestellt — nach *Palmer* und *Eckles*[2]) mit dem Urochrom identisch sein.

Quantitative Urochrombestimmung.

1. Eine von *Klemperer*[3]) ausgearbeitete colorimetrische Methode zur annähernden quantitativen Urochrombestimmung hat mehr klinisches Interesse.

2. Der mit Barythydrat und Bariumacetat vorbehandelte Harn wird in abgemessener Portion mit Kupferacetat gefällt, der Niederschlag in einer bekannten Menge Ammoniak gelöst. Nun fällt man die Purinkörper mit ammoniakalischer Silberlösung. Der Stickstoffgehalt der gut mit Wasser gewaschenen Kupferfraktion und der aus der entsprechend großen Harnmenge gewonnenen Silberfraktion wird bestimmt. Die Differenz beider Werte gibt den Urochromstickstoff (vgl. *Dombrowski*[4]).

Das sogenannte „Urochromogen", das *M. Weiss*[5]) als „Alkaptonchromogen" bezeichnet, bestimmt man nach diesem Autor, sowie nach *Baumgärtel*[6]) mit n/100-Permanganatlösung spektroanalytisch.

[1]) *Blyth*: Journ. Chem. Soc. **1879**. 530.

[2]) *Leroy S. Palmer* und *C. H. Eckles*: Journ. of biol. Chem. **17**. 251 (1914).

[3]) *G. Klemperer*: Die Messung des Harnfarbstoffes. Berl. klin. Wochensch. S. 313 (1903).

[4]) *St. Dombrowski*: Die Ausscheidung des Urochroms im Harn von gesunden Menschen sowie in einigen Krankheitsfällen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**. 390 (1907).

[5]) *Moriz Weiss*: Biochem. Zeitschr. **81**. 342 (1917); vgl. auch Note S. 746.

[6]) *Traugott Baumgaertel*: Biochem. Zeitschr. **85**. 162 (1918).

2. **Uroerythrin** (Purpurin, rosige Säure) ist der rote Farbstoff, der durch Adsorption an dem sogenannten Sedimentum lateritium, d. h. den spontanen Uratniederschlägen des Harnes haftet. Er wird aus diesem Uratsidement isoliert.

Er findet sich im normalen Harn, wird aber anscheinend durch allerlei Krankheiten, besonders solchen, welche eine Stauung des Leberkreislaufes herbeiführen, vermehrt. Genaue und sichere klinische Daten zu dieser Frage liegen nicht vor.

Methode der Isolierung nach *Garrod*[1]).

Das gesammelte Uratsediment wird unter gelindem Erwärmen in wenig Wasser gelöst. Durch Sättigen mit festem Ammoniumchlorid werden die gefärbten Urate wieder gefällt. Man filtriert ab und entfernt durch tüchtiges Waschen mit einer gesättigten Ammoniumchloridlösung andere etwa anhaftende Harnfarbstoffe (Urobilin!). Den Niederschlag digeriert man dann im Dunkeln einige Stunden lang mit heißem absoluten Alkohol, filtriert dann ab und verdünnt mit dem doppelten Volumen Wasser. Die entstehende Lösung wird zur Sicherheit mit Chloroform ausgeschüttelt (Entfernung von Hämatoporphyrin), dann mit Essigsäure schwach angesäuert und abermals mit Chloroform erschöpft. Die jetzt uroerythrinhaltige Chloroformlösung wird mit Wasser säurefrei gewaschen und bei niedriger Temperatur im Dunkeln verdunstet.

Nach *Borrien*[2]) wird das Uroerythrin aus Harn oder Harnsedimenten durch Schütteln mit Talkum auf diesem niedergeschlagen und daraus durch schwach HCl-sauren Alkohol gelöst.

Qualitativer Nachweis. Uroerythrin ist aus genuinem Harn mit Amylalkohol auszuschütteln. (Vorsicht vor Verwechslungen mit Urorosein.) Die Lösung wird durch konzentrierte Schwefelsäure carminrot, durch starke, fixe Alkalien über purpur und blau schnell grün gefärbt. Lösung wie Lösungsrückstand verblassen leicht im Licht.

Das Uroerythrin ist nach *Borrien* (l. c.) nicht Fe-haltig.

Mit Chlorzinkammoniak entsteht keine Fluorescenz (Gegensatz zu Urochrom bzw. Urobilin). Geeignete Lösungsmittel sind: Essigäther, Chloroform, Alkohol, Wasser.

Spektralprobe. In verdünnter alkoholischer Lösung eine breite Lichtabsorption, die in der Mitte zwischen *D* und *E* beginnt, genau bis *F* reicht und zwischen *E*, *b* eine kleine, schwache Aufhellung zeigt (das nach violett gelegene Band ist etwas dunkler).

---

[1]) *A. E. Garrod*: A contribution to the study of uroerythrin. Journ. of physiol. **17**. 439 (1895).

[2]) *V. Borrien*: Journ. Pharm. et Chim. (7.) **16**. 45 (1917).



Konzentrierte Lösungen zeigen einen zusammenhängenden, kontinuierlichen Schatten, der bei $\lambda = 552$ beginnt.

Nach *Borrien* (l. c.) zeigt die neutrale oder saure Lösung zwei unscharfe Banden bei λ 550 bis 525 und bei λ 510 bis 484.

3. **Urorosein**[1]) ist ein roter Farbstoff des Harnes, der aus einem farblosen Chromogen durch Behandeln des Harnes mit starker Salzsäure oder gleichzeitigem Zusatz einer Spur Chlorwasser oder Chlorkalk oder Nitrit als Oxydans entsteht; seine Menge ist bei Kranken vermehrt, sein Chromogen aber in jedem normalen Harn enthalten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser Farbstoff mit dem sogenannten Skatolrot identisch ist. Nach den jüngsten Beobachtungen *Herters* ist der Körper mit der Indolessigsäure identisch (vgl. S. 769 bei Skatolrot).

D a r s t e l l u n g d e s C h r o m o g e n s n a c h *Rosin*[2]).

Eine größere Harnmenge wird mit Bleizucker versetzt; die Fällung wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit Ammoniak versetzt, die neue Fällung wird mit der ersten Fällung vereinigt und bei mittlerer Temperatur getrocknet. Die fein zerriebenen Pulver extrahiert man am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol. Die Extraktion wird so lange fortgesetzt, als noch eine Alkoholprobe nach Zusatz von Chlorkalk und von Salzsäure Rotfärbung zeigt. Aus den ungefärbten alkoholischen Lösungen entfernt man Spuren von Blei mit Schwefelwasserstoff. Die alkoholischen Filtrate werden hierauf konzentriert, mit Äther gefällt und dann durch Verdunsten vom Äther befreit. Die Rückstände werden dann gut mit Äther zur Befreiung von Phenolen erschöpft und hierauf wiederum in ganz wenig Alkohol gelöst. Zu dieser Lösung wird Äther bis zu eben beginnender Trübung zugesetzt. Beim Stehen scheiden sich farblose Nadelkristalle des Chromogens ab. Ein kristallisiertes Chromogen erhielt auch *Herter* als Rückstand der Chloroformextrakte der entbleiten, nach *Rosin* vorbereiteten, farblosen Flüssigkeiten.

Q u a l i t a t i v e r N a c h w e i s i m H a r n u n d I s o l i e r u n g d e s U r o r o s e i n s. Man versetzt den Harn mit konzentrierter Salzsäure und Chlorkalk. Gewisse Harne geben je nach dem Reichtum an Chromogen und einem Gehalt an Nitraten die Rotfärbung schon nach Mineralsäurezusatz allein. In diesen Fällen wird die Oxydation durch Abspaltung von Nitriten durch die starke Säure oder durch bereits vorher bakteriell im Harn gebildete Nitrite vermittelt (*Herter*[3]). Das frei werdende Indigo wird

[1]) *M. Nencki* und *N. Sieber*: Urorosein, ein neuer Harnfarbstoff. Journ. f. prakt. Chem. **26**. 333 (1882).

[2]) *H. Rosin*: Ein Beitrag zur Lehre von den Harnfarbstoffen. Deutsche med. Wochenschr. S. 51 (1893); Zentralbl. f. klin. Med. S. 510 (1889).

[3]) *C. A. Herter*: Die Beziehung von nitrifizierenden Bakterien zur Uroroseinreaktion von *Nencki* und *Sieber*. Journ. of biol. Chem. **4**. 239 (1908).

durch Chloroform entfernt. Der rosa gefärbte Harn gibt den Farbstoff beim Durchspülen an Amylalkohol. Die rot gefärbte Amylalkohollösung entfärbt sich unter Bildung ungefärbter Salze beim Durchschütteln mit Lauge; die klare Amylalkohollösung, welche jetzt den reinen Farbstoff ohne beigemengte Pigmente enthält, färbt sich beim Ansäuern wieder rot.

Von Indigrot kann man auch auf folgendem Weg trennen:

Der farbige, uroroseinhaltige Harn wird alkalisch gemacht und bei dieser Reaktion mit Äther ausgeschüttelt. Es geht das farblose Natronsalz des Uroroseins mit Indigrot in Lösung. Nun schüttelt man mit Säure aus. Es bleibt das Indigrot in ätherischer Lösung, während das freie Urorosein die Säure rosa färbt.

Spektralprüfung. Die Lösungen in Amylalkohol geben einen scharf begrenzten Absorptionsstreifen bei $\lambda = 557\ \mu\mu$ im Grün zwischen D und E, und zwar näher an D. Diese Probe ist zur sicheren Identifikation unerläßlich[1]).

4. **Urobilin und Urobilinogen** ist in jedem normalen, entleerten Harn enthalten. Seine Menge ist bei Fieberkranken, Ikterischen und Leberkranken sowie sonstigen pathologischen Prozessen vermehrt. Sicher aber ist der Farbstoff ein physiologisches Produkt; Urobilin entsteht aus einem farblosen Chromogen unter dem Einfluß des Sonnenlichtes.

Außer im Harn kommt es im Dünndarm, Dickdarm, in den Faeces (nicht im Meconium) vor, wo es durch reduzierende Mikroorganismen aus Derivaten des Gallenfarbstoffes entsteht. Es ist ferner in der Kuhmilch, in menschlichen Plazenten und im Gewebssaft von Gastropoden enthalten.

Die Beziehung dieser Substanz zum Hydrobilirubin ist noch nicht sichergestellt.

Darstellung aus Harn. Methode nach *Garrod* und *Hopkins*[2]).

Man sättigt größere Harnmengen mit Salmiak und filtriert von der abgeschiedenen Harnsäure ab. Aus dem Filtrat wird das Urobilin durch Sättigen mit Ammonsulfat ausgefällt. Den entstandenen Niederschlag sammelt man auf einem Filter und trocknet. Aus dem trockenen Substanzgemenge wird das Urobilin mit viel Wasser extrahiert und aus seiner Lösung abermals durch Sättigen mit Ammonsulfat gefällt. Die Salzfällung wird hierauf im Scheidetrichter mit einer Mischung von 1 Teil Chloroform und 2 Teilen Äther durchgeschüttelt. Der Chloroformlösung wird der Farbstoff

[1]) Vgl. ferner *E. Salkowski*: Biochem. Zeitschr. **97**. 123 (1919).

[2]) *A. E. Garrod* und *F. G. Hopkins*: Über Urobilin. Journ. of physiol. **20**. 112 (1898); **22**. 451 (1898).



mit schwach ammoniakhaltigem Wasser entzogen und eventuell nochmals mit $Am_2 SO_4$ gefällt und schließlich wieder in Chloroform aufgenommen. Der Chloroformrückstand wird schließlich in Alkohol gelöst. Der Rückstand der filtrierten Alkohollösung ist reines Urobilin.

Methode nach *Jaffé*[1]).

Der Harn, am besten Fieberharn, wird mit Bleiessig gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit Wasser gewaschen bei Zimmertemperatur getrocknet und mit Alkohol energisch ausgekocht. Der verbleibende Rückstand wird mit kaltem, schwefelsäurehaltigem Alkohol zerlegt und in Lösung gebracht. Die filtrierte Lösung wird kräftig mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Chlorzink ausgefällt. Der entstehende Niederschlag wird nun mit Wasser chlorfrei gewaschen, mit kochendem Alkohol erschöpft, bei Zimmertemperatur getrocknet, in Ammoniak gelöst und erneut mit Bleizucker gefällt. Der neu entstandene Niederschlag wird wiederum mit Wasser gewaschen, mit Alkohol ausgekocht und durch schwefelsäurehaltigen Alkohol zerlegt.

Die abfließende alkoholische Lösung wird mit dem halben Volumen Chloroform versetzt und mit Wasser vorsichtig, ohne starkes Schütteln, erschöpft. Die mit Wasser gewaschene Chloroformlösung wird abgetrennt. Der Destillationsrückstand ist Urobilin.

In urobilinreichen Harnen (qualitative Vorprobe!) kann man die erste Bleifällung unterlassen und sofort mit Chlorzinkammoniak ausfällen und, wie beschrieben, weiter behandeln.

Die Ausbeuten sind gering, die Reinheit des Farbstoffes aber eine große.

Methode von *Huppert* und *Müller*[2]).

Aus dem Harn fällt man zunächst Harnsäure und etwa vorhandene Blutfarbstoffe mit alkalischer Chlorbariumlösung (1 Volumen gesättigter $Ba Cl_2$-Lösung auf 2 Volumen gesättigter Barytlösung, hiervon 30 Teile auf 100 Teile Harn). Aus dem Filtrat dieser Fällung beseitigt man den Baryt durch konzentrierte Natriumsulfatlösung, dann neutralisiert man nahezu mit Schwefelsäure, filtriert und fällt erneut durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat. Eine eventuell auftretende saure Reaktion wird mit NH_3 abgestumpft. Die Fällung wird nach einigen Stunden auf Faltenfiltern gesammelt und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, an der Luft ohne Erwärmen getrocknet und dann warm und noch feucht mit einer Lösung von 1 Teil Äther mit 2 Teilen Alkohol heiß extrahiert.

[1]) *M. Jaffé*: Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. *Virchows* Arch. **47**. 405 (1869).

[2]) *H. Huppert*: Analyse des Harnes. 10. Aufl. S. 527. Vgl. hierzu. *G. Hoppe-Seyler*: Über die Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten *Virchows* Arch. **124**. 31 (1891).



Alsdann mischt man die Extrakte in der bereits beschriebenen Weise mit Chloroform und schüttelt im Scheidetrichter mit dem doppelten Volumen Wasser durch. Die abgetrennte Chloroformlösung wird noch mehrmals mit Wasser gewaschen. Schließlich entzieht man das Urobilin der Chloroformlösung durch Schütteln mit ammoniakhaltigem Wasser. Das Urobilin bleibt als Abdampfrückstand der Ammoniaklösung. Besser ist es, den Farbstoff mit Säure zu fällen, abermals in Chloroform aufzunehmen und als Chloroformrückstand bei gewöhnlicher Temperatur zu gewinnen.

Darstellung von Urobilinogen nach *Saillet*[1]).

Der eiweißfreie Harn (100 cm^3) wird im Dunkeln entleert, mit 10 Tropfen Eisessig versetzt und mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Den Essigäther verwendet man jeweils zur Extraktion neuer Harnportionen, indem man Verluste durch neuen Zusatz ergänzt. Durch Schütteln mit wenig Wasser entzieht man dem Essigäther etwa bereits vorhandenes Urobilin. Im Falle seiner Anwesenheit färbt sich das Wasser braun. Den Nachweis des Urobilinogens erbringt man nun, indem man die Essigätherlösung der Lichtwirkung aussetzt und das sich bildende Urobilin wiederum mit angesäuertem Wasser extrahiert und nach einer der folgenden Methoden qualitativ identifiziert.

Qualitativer Nachweis und Identifikation des Urobilins. Von den äußeren Eigenschaften des Urobilins ist die Fluorescenzerscheinung seiner alkalischen Lösung und das charakteristische Spektralbild der Absorptionsstreifen verwertbar. Letzteres allein gestattet die Identifikation des isolierten Farbstoffes.

I. Im Harn:

1. Man versetzt den Harn mit einigen Tropfen Schwefelsäure und prüft spektroskopisch (s. u.); stark dunkelgefärbte Harne verhindern bisweilen die spektroskopische Analyse. In diesem Falle beseitigt man die Farbstoffe (Gallenfarbstoffe) durch Zusatz von dem halben Volumen an *Deniges*' Reagens (5 *g* Hg O in 20 cm^3 Schwefelsäure + 100 cm^3 Wasser) und prüft das Filtrat der entstehenden Fällung.

2. Man versetzt den Harn mit Ammoniak, filtriert und setzt etwas (10%) Chlorzinklösung zu. Das Auftreten einer rotgrünen Fluorescenz zeigt Urobilin an. Die Probe wird durch spektroskopische Prüfung der fluorescierenden Lösung kontrolliert.

---

[1]) *Saillet*: Über das Urobilin im normalen Harn. Rev. de méd. **17**. 109 (1897); vgl. auch *Hans Fischer* und *Fr. Mayer-Betz*: Zeitschr. f. physiol Chem. **73**. 204; **75**. 232 (1911).



Man kann auch nach *Schlesinger*[1]) derart verfahren, daß man zu dem Harn das gleiche Volumen einer 10%igen, absolut alkoholischen Zinkacetatlösung zufügt und dann filtriert. Die leichteste Fluorescenz läßt sich mit einer Konvexlinse beobachten.

3. Sind die Harne dunkel gefärbt oder urobilinarm, so extrahiert man das Urobilin, indem man etwa 50 *cm*³ Harn mit einigen Tropfen Salzsäure ansäuert und mit 25 *cm*³ Amylalkohol unter gelindem Durchmengen extrahiert[2]). Die beiden Lösungen schickt man durch ein kleines Filter und prüft dann die abgetrennte amylalkoholische Schicht spektroskopisch und auf Fluorescenz nach Zusatz einer alkoholischen Chlorzink- oder Zinkacetatammoniaklösung. 1 *g* Chlorzink in 100 *g* ammoniakhaltigen Alkohol.

Die Methoden der Extraktion sind mannigfaltig modifiziert worden:

Nach *Roman* und *Deluc*[3]): Man säuert 100 *cm*³ Harn mit 8 bis 10 Tropfen Salzsäure an und schüttelt vorsichtig mit 20 *cm*³ Chloroform aus. Von der durch ein Asbestfilter geschickten Chloroformlösung werden 2 *cm*³ mit dem doppelten Volumen einer 0·1 %igen alkoholischen Zinkacetatlösung überschichtet. An der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten entsteht ein grüner Ring. Beim Umschütteln tritt grüne Fluorescenz in der ganzen Mischung auf (grün im auffallenden, rot im durchfallenden Licht).

Nach *Hausmann*[4]) versetzt man 10 bis 20 *cm*³ Harn mit 1 bis 2 *cm*³ einer 10%igen $CuSO_4$-Lösung (wobei Urobilinogen zu Urobilin oxydiert wird) und schüttelt mit 2 *cm*³ Chloroform vorsichtig aus. Das Chloroform färbt sich dabei rosa, orange oder kupferrot. Bei stark saurem Harn ist die Farbe gelb. Zur quantitativen Bestimmung des so nachmehrfacher Extraktion gewonnenen Urobilins nimmt man den Trockenrückstand der $CHCl_3$-Lösung mit n/10 NaOH auf und titriert mit n/10 HCl zurück. Die Differenz wird mit 0·0062 multipliziert.

Andere Methoden, die keine Vorzüge bieten, sind von *Grimbert* und *Jolles*[5]) angegeben.

Versagen auch diese Proben, so ist die Isolierung aus größeren Harnmengen nach einer der beschriebenen Methoden am Platz.

---

[1]) *W. Schlesinger*: Zum klinischen Urobilinnachweis. Deutsche med. Wochenschr. S. 561 (1903).

[2]) *M. Nencki* und *A. Rotschy*: Zur Kenntnis des Hämatoporphyrins. und des Bilirubins. Monatsh. f. Chem. **10**. 568 (1889).

[3]) *Th. Roman* und *G. Deluc*: Nachweis von Urobilin im Harn. Journ. de Pharm. et Chim. (6. Serie). **12**. 49 (1900); ibid. **19**. 425.

[4]) *Th. Hausmann*: Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **13**. 373 (1913).

[5]) *L. Grimbert*: Aufsuchung von Urobilin im Urin. Compt. rend. de la soc. de biol. **56**. 599 (1904).

Spektroskopische Prüfung. Verdünnte Säurelösungen zeigen einen Absorptionsstreifen zwischen *C* und *F*, mehr an *F* und etwas über *F* hinausgehend. In alkalischer Lösung ist der Streifen weniger stark und mehr nach *C* gerückt, am schwächsten in ammoniakalischer Lösung. In Anwesenheit von Chlorzink aber ist der Streifen sehr deutlich.

Nach *Lewin* und *Stenger*[1]) findet man in alkoholischen und wässerigen sauren Lösungen einen Streifen auf der Grünblaugrenze bei λ 494. Die Lageschwankungen betragen nur 3 $\mu\mu$. Durch Alkalisierung tritt Verschiebung nach dem roten Ende des Spektrums ein.

Hat man einen bereits isolierten Farbstoff als Urobilin zu identifizieren, so ist das spektroskopische Verhalten besonders charakteristisch.

1. In saurer oder neutraler Lösung in Alkohol oder Chloroform: breiter Streifen zwischen *E* und *F*, der, bei starker Konzentration etwas über *F* hinausreichend, gleichmäßig in die Verdunkelung im Violett übergeht.

2. Nach Alkalisieren verdünnter Lösungen: Verschwinden des genannten Streifens. Nach Zusatz von Chlorzink Auftreten eines einzigen breiten Streifens ziemlich in der Mitte zwischen *E* und *F*, näher dem Rot zu gelegen, ohne Verdunkelung in Violett.

3. In konzentrierten Lösungen: Nach Ansäuern einer konzentrierten Urobilinlösung in schwacher Lauge mit Schwefelsäure zu eben beginnender Trübung entsteht ein neues Band an der Linie *E* neben dem Spektrum des sauren Urobilins (sub 1). Der Streifen ist mit γ durch einen Schatten verbunden.

Handelt es sich um die Isolierung oder den Nachweis von Urobilin in Faeces oder anderen Gewebssäften, so ist eine Darstellung des Farbstoffes durch vorangehende Isolierung immer zweckmäßig.

II. Aus Faeces. Man extrahiert die Faeces durch Zerreiben mit schwefelhaltigem Alkohol, engt das Extrakt bei 40 bis 50° ein und nimmt, wie bei der Isolierung nach *Huppert*, in Chloroform auf. Die spektroskopische Probe und Fluorescenzprüfung entscheidet dann. Tritt keine Fluorescenz auf, so überzeugt man sich, ob nicht nach Zusatz von 1 Tropfen Jodtinktur zu 10 cm^3 Alkoholextrakt Urobilinogen in Urobilin übergeht, *Steensma*[2]).

In anderen Fällen extrahiert man die Fäces mit verdünnter Schwefelsäure (2$^0/_{00}$) und isoliert durch Fällung mit Ammonsulfat nach *Garrod* (s. o.).

[1]) *L. Lewin* und *E. Stenger*: *Pflügers* Arch. **144**. 279 (1912).

[2]) *F. A. Steensma*: Über die Untersuchung der Fäces auf Urobilin. Nederl. Tijdschr. f. Geneesk. 1. 273 (1907).



Ohne Isolierung kann man Urobilin in Faeces nach Angaben von *Schmidt*[1]) feststellen. In einem kleinen, weißen Porzellanschälchen verreibt man die Faecesprobe mit gesättigter, wässeriger Sublimatlösung und läßt dann in einem Uhrschälchen 24 Stunden lang bedeckt stehen. Rote bis tiefrote Teile, die makroskopisch oder auch mikroskopisch erkenntlich sind, zeigen Urobilin, grüne Teile Bilirubin an.

III. Nachweis im Blut nach *Fromholdt* und *Nersessow*[2]): 50 bis 100 cm^3 Blut werden mit der vierfachen Menge Alkohol versetzt und filtriert. Die auf 15 cm^3 konzentrierte alkoholische Lösung wird mit HCl schwach angesäuert, mit Amylalkohol ausgeschüttelt und zentrifugiert. Der Amylalkohollösung entzieht man Urobilin und Bilirubin mit alkalischem Wasser. Nach dem Wiederansäuern schüttelt man abermals mit Amylalkohol aus und prüft spektroskopisch.

Versuche quantitativer Urobilinbestimmungen im Harn[3]):

a) Gravimetrisch nach *Hoppe-Seyler* (s. S. 754, Note 1).

In einer abgemessenen Harnmenge wird das Urobilin nach *Garrod* bei schwefelsaurer Reaktion mit Ammoniumsulfat gefällt. Der nach geraumer Zeit abfiltrierte Niederschlag wird auf einem Filter gut mit gesättigter $Am_2 SO_4$-Lösung gewaschen, oberflächlich getrocknet und in gleichen Teilen Alkohol und Chloroform aufgenommen. Im Scheidetrichter bringt man durch Wasserzusatz das Chloroform zur Abscheidung. Nach vollständiger Klärung derselben führt man dieselbe in ein gewogenes Becherglas über, läßt abdunsten und trocknet schließlich bei 100°. Hierauf extrahiert man abermals mit Äther und filtriert den Äther ab. Der Filterrückstand (das Urobilin) wird nun, in Alkohol aufgenommen, in dem früheren Becherglas gesammelt. Nach Verdunsten und Trocknen wird das Urobilin gewogen.

b) Spektrophotometrische Bestimmung nach *Saillet* (s. S. 755, Note 1).

In einer sauren Urobilinlösung mit einer Dicke der Flüssigkeitsschichte von 15 *mm* liegt die Grenze der Wahrnehmbarkeit des Absorptionsbandes bei einer Konzentration von 1 *mg* Urobilin in 22 cm^3 Lösung. Man verdünnt daher die fragliche, urobilinhaltige Lösung bis zu der Grenze der eben verschwindenden Wahrnehmbarkeit eines Absorptionsstreifens bei einer Flüssigkeitsdichte von

---

[1]) *A. Schmidt*: Über Hydrobilirubinbildung im Organismus unter normalen Verhältnissen. Verh. d. 13. Kongr. f. innere Med. S. 320 (1895).

[2]) *G. Fromholdt* und *N. Nersessow*: Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **11**. 400 (1912).

[3]) Vgl. auch Methode von *Hausmann*, S. 756.

15 *mm* und berechnet aus dem vorhandenen Gesamtvolumen der Flüssigkeit die Urobilinmenge. Natürlich müssen zu dieser Bestimmung reine Urobilinlösungen verwandt werden. Zu diesem Zweck sammelt man den Harn bei Petroleumlicht, säuert ihn mit Essigsäure an und extrahiert das Urobilinogen mit Essigäther. In der abgetrennten Lösung wird durch Schütteln mit Salpetersäure das Chromogen zu Urobilin oxydiert. Durch Schütteln mit ammoniakalischem Wasser geht dieses quantitativ in die wässerige Lösung über. Nun säuert man abermals mit Salzsäure an und verdünnt mit Wasser bis zu der oben genannten Grenze unter Kontrolle im Spektroskop. Kennt man die Schichtdicke der untersuchten Lösung E und die Menge derselben V, so ergibt sich die Urobilinmenge aus der Formel: $x = \frac{V}{22\,cm^3} \times \frac{15\,mm}{E}$.

Nach *Brugsch* und *Retzlaff*[1]) verfährt man zur Bestimmung des Urobilins — im Harn oder in den Faeces — wie folgt: 0·5 *l* Harn wird mit Ammoniumcarbonat alkalisch gemacht und zirka zwei Tage bei 37° stehen gelassen. Dann extrahiert man mit Ligroin so lange, bis die *Ehrlich*-Aldehydprobe negativ wird, säuert sodann mit Weinsäure an und extrahiert mit Äther. 2 cm^3 der ätherischen Lösungen ergeben mit 0·2 cm^3 kalt gesättigter *Ehrlich*-Aldehydlösung und 3 Tropfen salzsäuregesättigten Alkohols die zur Spektroskopie geeignete Lösung.

Qualitativer Nachweis des Urobilinogens. Der nicht dem Licht ausgesetzte Harn wird angesäuert. Durch Extraktion mit Essigäther oder Chloroform, Ätheramylalkohol entstehen Lösungen, mit denen die Urobilinproben gelingen, wenn das Chromogen durch Oxydantien (Jod, Permanganat, Salpetersäure) in den Farbstoff verwandelt ist. Beim Versetzen mit Paradimethylaminobenzaldehyd[2]) und nachträglichem Erhitzen entsteht eine Rotfärbung mit einem breiten Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E* im Orange [*Neubauer*[2]), *Hildebrandt* u. a.[3])].

Nachweis von Urobilinogen in Faeces. Aus einer Probe von Faeces werden Indol und Skatol durch Verreiben mit Ligroin entfernt. Der Rückstand wird mit Alkohol extrahiert. Mit der filtrierten Probe des Extraktes wird die Reaktion mit

[1]) *Th. Brugsch* und *Karl Retzlaff*: Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **11**. 508 (1912); vgl. ferner *S. Marcussen* und *Svend Hansen*: Journ. Biol. Chem. **36**. 381 (1918) (Bestimmung auf Grund der Fluorescenz mit alkoholischer Zinkacetatlösung).

[2]) *M. Neubauer*: Über die neue *Ehrlich*sche Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München. Juli 1903.

[3]) *W. Hildebrandt*: Studien über Urobilinurie und Ikterus. Zeitschr. f. klin. Med. **59**. 351 (1905).

p-Dimethylaminobenzaldehyd angestellt (die Probe ist aber nicht absolut eindeutig, da sie auch mit den durch Reduktion von Bilirubin, Hämatoporphyrin, Hämatin und Chlorophyll entstehenden Körpern — die allerdings vielleicht mit Urobilinogen identisch sind — positiv ausfällt).

IV. Harnfarbstoffe der Indol- und Skatolgruppe und ihre Chromogene.

Das Tryptophan des Eiweiß erleidet im Darmkanal durch die Fäulnisbakterien eine tiefgreifende Veränderung. Als Endprodukte dieses Abbaues entstehen schließlich Indol und Skatol. Beide Körper werden resorbiert und im intermediären Stoffwechsel zu Indoxyl bzw. Skatoxyl oxydiert. Diese Oxydationsprodukte werden schließlich durch Paarung mit Schwefelsäure oder Glykuronsäure entgiftet und in dieser gepaarten Form im Harn aus dem Körper entfernt.

Diese gepaarten Indoxyl- oder Skatoxylsäuren sind nun die Chromogene für eine Anzahl blauer und roter Farbstoffe, die aus ihnen durch Spaltung und nachfolgende Oxydation des Indoxyl- bzw. Skatoxylpaarlings entstehen können. Bisweilen finden sich die Farbstoffe im Harn bereits vor, d. h. sie entstehen ohne äußere experimentelle Eingriffe durch abnorme, pathologische Zersetzungen der Harne oder sie, werden aus dem im Harn präexistierenden Chromogen durch äußere Mittel erst dargestellt.

Man kennt ein Indigblau (Indigotin) von der Formel

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C:C\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C_6H_4$$

und ein mit diesem isomeres Indigrot (Indirubin) von der Formel

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\NH\end{matrix}\right\rangle C:C\left\langle\begin{matrix}C\,(OH)\\C_6H_4\end{matrix}\right\rangle N,$$

die beide durch Oxydation des Indoxyls (Indikan) entstehen. Ein als Skatolrot bezeichneter roter Farbstoff ist hinsichtlich seiner Genese noch nicht ganz aufgeklärt. Er wurde von manchen Autoren als ein dem Indirubin analoges Derivat eines hypothetischen Skatoxyls aufgefaßt, von anderen als der Abkömmling eines spezifischen, andersartigen Chromogens aufgefaßt (*Maillard*, *Staal*) oder als mit dem Urorosein des Harnes identisch erklärt (*Porcher*, *Hervieux-Grosser*). *Herter* hält den Körper für Indolessigsäure.

Die Mengen, in denen diese drei Farbstoffe im Harn auftreten oder entstehen können, sind abhängig von der Menge ihrer Chromogene, die ihrerseits von dem Maß der Darmfäulnis, der Eiweißfäulnis und mithin von der Ernährungsweise oder der Tierspezies wesentlich beherrscht werden. Da es nun durch experimentelle Bedingungen gelingt, die präformierten Chromogene quantitativ in die Farbstoffe umzusetzen, so besitzen wir in der Darstellung dieser Farbstoffe ein Mittel, das Chromogen qualitativ und quantitativ zu bestimmen, den Farbstoff quantitativ zu isolieren und denselben, d. h. also auch sein Chromogen chemisch zu identifizieren.

1. **Indoxyl.** Qualitativer Nachweis von Indoxyl durch Überführung in Indigblau (Indikanreaktionen).

Methode nach *Jaffé*[1]).

Man fügt zu einer Probe des Harnes (etwa 10 *cm*³), der eventuell vorher von Eiweiß befreit ist, das gleiche Volumen konzentrierter Salzsäure, hierauf unterschichtet man mit 2 bis 3 *cm*³ Chloroform. Das durch die Salzsäure in Freiheit gesetzte Indoxyl wird nun durch vorsichtiges Zufügen von 1 bis 3 bis 5 Tropfen einer kalt gesättigten Chlorkalklösung zu Indigblau oxydiert. Durch vorsichtiges, aber häufiges Umdrehen des verschlossenen Reagensglases wird der blaue Farbstoff von dem die Flüssigkeit passierenden Chloroform aufgenommen. Die Färbung des Chloroforms ist von der Menge des vorhandenen Indoxyls und von der Intensität seiner Oxydation abhängig.

An Stelle des Chlorkalkes sind andere Oxydationsmittel empfohlen: z. B. 10%ige Natriumpersulfatlösung. Ammoniumpersulfat, 1%ige Kaliumchloratlösung, Wasserstoffsuperoxyd oder Eisenchlorid.

Die Wahl eines dieser Oxydantien steht natürlich frei. Wichtig ist nur, die Menge des Oxydans so zu wählen, daß die Zerstörung des bereits gebildeten Indigblaus oder seine Umwandlung in das Indirubin verhindert wird. Ein Überschuß vermag das Indigo sehr rasch in farbloses Isatin zu verwandeln. Mit Rücksicht darauf dürfte sich die Wahl eines gelinden Oxydans eher empfehlen, das in der Probe nach *Obermayer* mit Eisenchlorid seine Anwendung findet.

Methode nach *Obermayer*[2]).

Man fällt den Harn zuerst mit der Hälfte seines Volumens mit 10%iger Bleizuckerlösung, filtriert und schüttelt die Probe

[1]) *M. Jaffé*: Nachweis und quantitative Bestimmung des Indikans. *Pflügers* Arch. 3. 448 (1870).

[2]) *F. Obermayer*: Modifikation der *Jaffé*schen Indikanprobe. Wiener klin. Wochenschr. 1890. S. 176.

mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure, welche 2% Eisenchlorid enthält. Man wiederholt dann das Umschütteln nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Chloroform.

Die Probe ist entschieden jener von *Jaffé* vorzuziehen, da man durch die Bleifällung von störenden Einflüssen anderer Farbstoffe befreit ist und da eine Emulgierung der beiden Flüssigkeiten beim Umschwenken des Reaktionsgemisches weniger leicht erfolgt.

Immerhin ist man aber auch bei Anwendung besonders älterer Lösungen des Reagens nach *Obermayer* auch nicht vor Überoxydation sicher. Natürlich ist die Anwendung des Eisenchloridreagens bei Harnen mit Phosphatreichtum oder bei Vorhandensein von Acetessigsäure, Antipyrin, Salicylaten nicht am Platze (*Gnezda*).

Methode von *Ehrlich*[1]).

Man erhitzt eine Harnprobe mit der gleichen Menge einer Lösung von 0·33 *g* Dimethylparaaminobenzaldehyd in 50 *cm*³ Wasser + 50 *cm*³ konzentrierter Salzsäure zum Sieden und alkalisiert die abgekühlte Lösung mit Kalilauge oder Ammoniak. Rotfärbung beweist Indikananwesenheit (Gallenfarbstoff und urobilinogenhaltige Harne sind zu dieser Probe nicht zu verwenden).

Bei allen qualitativen Proben darf nur mit Vorsicht aus der Intensität der Chloroformfärbung auf den Indikangehalt geschlossen werden. Einesteils können durch Bildung von Indigrot neben Indigblau (Indigrot, entstanden durch Kondensation des durch Überoxydation erzeugten Isatins mit Indoxyl) Mischfarben entstehen, zum anderen aber ist die Intensität der Färbung auch von dem spezifischen Gewichte des Harnes abhängig, indem sie unabhängig von dem wirklichen Indikangehalt mit dem Steigen des spezifischen Gewichtes des Harnes an Intensität zu- bzw. abnimmt (*Serkowski*).

Auch wird diese Beurteilung bisweilen dadurch erschwert, daß sich anstatt der Blaufärbung der Chloroformextrakte eine violette Mischfarbe einstellt; dieselbe ist die Folge einer Überoxydation und spontanen Bildung von Indigrot oder von einer Isatinbildung und Kondensation desselben mit präformiertem Indoxyl zu Indigrot[1]).

---

[1]) *P. Ehrlich*: Über die Dimethylaminobenzaldehydreaktion. Deutsche med. Wochenschr. **1901**. Nr. 15; *J. Gnedza*: Nachweis von Indoxyl in gewissen pathologischen Harnen. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. **136**. 1406 (1903); Chem.-Ztg. **27**. 676 (1903).

[2]) Über Indoxylnachweis im Gelbsuchtsharn vgl. *Louis Bélières*: Journ. Pharm. et Chim. (7.) **8**. 429 (1913); ferner *Ed. Justin-Müller*: Bull. des sciences Pharm. **23**. 85 (1916); Journ. Pharm. et Chim. (7.) **15**. 249 (1917); *G. Hoppe-Seyler*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 171 und 250 (1916).



Quantitative Bestimmungen des Indoxyls bzw. Indigblaus (Indikan).

Methode nach *Wang*[1]).

Dieselbe beruht im Prinzip darauf, daß das gesamte Indoxyl nach *Obermayer* in Indigo, dieses dann in Indigblausulfonsäure umgewandelt wird, und die Menge der letzteren durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt wird.

Man überzeugt sich durch qualitative Vorproben über den Reichtum des Harnes an Indikan und wählt je nachdem die Menge Ausgangsmaterial (25 bis 50 cm^3 Harn bei Indikanreichtum, 300 cm^3 normalen Harn). Die 300 cm^3 Harn werden dann portionenweise mit 25 bis 50 cm^3 einer 20%igen Bleiacetatlösung versetzt und filtriert, 250 cm^3 des Filtrates werden in einem Scheidetrichter mit 250 cm^3 von *Obermayers* Reagens (konzentrierter HCl mit 2‰ Eisenchlorid) und 30 cm^3 Chloroform versetzt und jeweils eine Minute geschüttelt. Hierauf läßt man die Chloroformschicht vorsichtig ab und wiederholt die Ausschüttelungen mit neu zugefügten Chloroformmengen, bis die Chloroformextrakte farblos bleiben. Im allgemeinen genügen drei Ausschüttelungen. Die in einem Kölbchen gesammelten Chloroformextrakte werden zur Reinigung und Befreiung von salzsauren und organischen Verunreinigungen (Urobilin, Kresole, Phenole, aromatische Säuren, Oxysäuren) zwei- bis dreimal mit reinem Wasser und dann mit Natronlauge (1:1000) geschüttelt [*Maillard*[2]), *Gnezda*]. Durch Waschen mit Wasser werden die letzten Spuren Alkali entfernt. Hierauf wird die Chloroformlösung durch etwas Asbest filtriert. Das Filtrat wird durch Destillation von Chloroform befreit, der Rückstand kurze Zeit auf dem Wasserbad getrocknet und dann noch warm mit 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nachdem sich durch vorsichtiges Schütteln und Erwärmen auf dem Wasserbad während zehn Minuten alles gelöst hat, verdünnt man vorsichtig mit einer größeren Wassermenge. Geht nicht der gesamte Chloroformrückstand in Lösung, so filtriert man die verdünnte Lösung quantitativ von braunen Flocken ab und wäscht das Filter gut mit heißem Wasser aus. Nunmehr titriert man die schön blaue durchsichtige Lösung mit einer Kaliumpermanganatlösung, die auf eine Oxalsäurelösung von bekanntem Gehalt eingestellt ist. Man verwendet am besten ein Gemisch von 5 cm^3 einer 3‰ $KMnO_4$-Lösung + 195 cm^3 Wasser, deren Titer vorher bestimmt ist. Die Titrierung ist beendet,

[1]) *E. Wang*: Über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**. 406 (1898); vgl. daselbst **27**. 135 (1899); **28**. 576 (1899).

[2]) *L. C. Maillard*: Über die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bedeutung des Harnindoxyls. Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**. 437 (1904); *E. Salkowski*: Indikanbestimmung. Ibid. **42**. 213 (1904).

wenn eine grünliche Färbung verschwunden oder Gelbfärbung bzw. Farblosigkeit eingetreten ist.

Durch Multiplikation des Oxalsäurewertes der Titerlösung mit 1·04 ergibt sich die gefundene Indigomenge.

Beispiel:

1 cm^3 KMn O_4-Lösung (etwa 3 $^0/_{00}$) = 0·00596 g Oxalsäure
1 „ „ = 0·0062 „ Indigo
1 „ der verdünnten KMn O_4-Lösung (5 : 195) = 0·00015 „ „

Es seien verbraucht 4·3 cm^3 KMn O_4-Lösung = 0·00065 g Indigo von dem ursprünglichen Flüssigkeitsvolumen (300 Harn + 25 cm^3 Bleizuckerlösung) wurden verwendet 250 cm^3.

Also: 250 : 0·00065 = 325 : x.

x = 1·3 . 0·00065 = 0·000845 g Indigo in 300 cm^3 Harn.

Methode nach *Bouma*[1]).

Sie beruht im Prinzip darauf, daß sich das durch Säurespaltung in Freiheit gesetzte Indoxyl mit Isatinsalzsäure zu dem einheitlichen Indigorot umsetzt, das nachher mit einer auf reines Indigrot eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert wird.

Auch hier überzeugt man sich durch colorimetrische Vorproben von dem bestehenden Indoxylreichtum, indem man gleiche Mengen Harn und Isatinsalzsäurereagens (20 mg Isatinum *Merck* purissimum in 1000 cm^3 chemisch reinster, eisenfreier konzentrierter Salzsäure) kocht und mit etwas Chloroform ausschüttelt. Indikanreichtum veranlaßt eine dunkelweinrote, Indikanarmut eine helle rosarote Färbung des Chloroforms. Im ersteren Falle verarbeitet man 25 bis 50 cm^3, im letzteren Falle 300 cm^3 Harn. Diese 300 cm^3 werden mit 30 cm^3 basischem Bleiacetat gefällt; von dem klaren Filtrat werden 275 cm^3 (= 250 cm^3 Harn) abgemessen und eine viertel Stunde lang mit dem gleichen Volumen der Isatinsalzsäurelösung auf dem Wasserbad erhitzt. Die abgekühlte Flüssigkeit wird dann in der oben beschriebenen Weise (Methode von *Wang*) mit dreimal 30 cm^3 Chloroform erschöpft. Nach dem Absetzen gießt man die Chloroformlösung vorsichtig in ein Kölbchen, destilliert die Hauptmasse Chloroform am Wasserbad ab und trocknet zwei Stunden bei 110°. Aus dem Rückstand entfernt man das überschüssige Isatin und die Salzsäure durch mehrfaches Waschen mit heißem Wasser. Das Residuum trocknet man abermals, löst wie bei *Wang* (s. o.) in Schwefelsäure, verdünnt und titriert mit Permanganatlösung.

[1]) *J. Bouma*: Über Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**. 82 (1901). Nachtrag zur Methode der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 356 (1903).

Die Indigolösung sowie die Titrierflüssigkeiten müssen vollkommen klar sein. Die Verdünnung der Indigorotflüssigkeit soll die Verdünnung von 1 *g* Indigrotdisulfonsäure auf 20.000 cm^3 Wasser nicht überschreiten. Erfolgt beim Titrieren eine Braunfärbung durch Abscheidung allerfeinsten Mangandioxydes, so ist der Säuregrad mit starker Schwefelsäure zu erhöhen.

Die Berechnung der gefundenen Indigomenge erfolgt in der Weise, daß man die Permanganatlösung vorher auf eine Lösung von reinem Indigorot einstellt. Diese Lösung bereitet man sich derart, daß man käufliches Indigorot in Chloroform löst, aus dem Verdampfungsrückstand das reine Indigrot in Äther aufnimmt und den getrockneten Ätherrückstand (= gereinigtes Indigrot) in einer Menge von 5 oder 10 *mg* genau abwägt und in konzentrierter Schwefelsäure löst. Hierzu fügt man zu beliebiger Verdünnung Wasser und bestimmt durch Titration mit einer Permanganatlösung (siehe bei *Wang*) diejenige Menge Permanganat, welche 1 *mg* Indigrot entspricht. Bei der Umrechnung der im Hauptversuch der Indoxylbestimmung verbrauchten Permanganatmenge (ausgedrückt in Kubikzentimetern der verbrauchten, vorher eingestellten Lösung) ist die Hälfte von dem gefundenen Wert für die Menge präformierten Indoxyls in Rechnung zu setzen, da ja die Hälfte des Indigrotmoleküls von dem im Versuch zugeführten Isatin geliefert worden ist.

Beide Methoden, die von *Wang* und *Bouma*, sind klinisch verwertbaren Bestimmungsmethoden ausgearbeitet worden, indem die aus dem Harn gewonnene blaue Chloroformlösung colorimetrisch mit einer Testlösung von Indigotin in Chloroform (*H. Strauß*[1]), jene des Indigrots mit einer Standardlösung von Indigrot (*Bouma*[2]) verglichen wird. Die Bestimmung nach *Bouma*, die die Benutzung eines käuflichen Indikanurometers erfordert, scheint sehr exakte Resultate zu geben (*Verum*). Die Beschreibung der Methode mag mit Rücksicht auf die dem Apparat beigegebene Gebrauchsanweisung hier übergangen werden.

M e t h o d e v o n *Ellinger*[3]).

Im wesentlichen wird die Methode von *Wang* beibehalten. Man verwende sauer reagierenden bzw. mit Essigsäure schwach

[1]) *H. Strauß*: Zur Methodik der quantitativen Indikanbestimmung Deutsche med. Wochenschr. **29**. 299 (1902).

[2]) *J. Bouma*: Über eine bisweilen vorkommende Abweichung bei der Bestimmung des Harnindikans als Indigorot mittels Isatinsalzsäure. Deutsche med. Wochenschr. **28**. 705 (1902); *H. P. T. Verum*: Quantitative Indikanbestimmung mit dem *Meisling*schen Jolorimeter. Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**. 459 (1905).

[3]) *A. Ellinger*: Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**. 192 (178) (1903).

angesäuerten Harn, dessen spezifisches Gewicht 1020 nicht überschreiten soll. Durch 0·1 Volumen Liquor. plumbi subacetici wird eine abgemessene Harnmenge erst gefällt. Ein abgemessenes Filtratvolumen wird dann nach *Wangs* Vorbild mit frisch bereitetem Reagens von *Obermayer* und Chloroform behandelt. Der nach *Wang* gewonnene Trockenrückstand der Chloroformextrakte wird mit Wasser gut gewaschen und nach Lösen in 10 *cm*³ H_2SO_4 und Verdünnen mit 100 *cm*³ Wasser mit $KMnO_4$ titriert. Der Titer der Stammlösung des Permanganates (zirka 3 *g* auf 100 *cm*³ H_2O) wird auf reines Indigotin eingestellt.

Qualitativer Nachweis von Indoxyl durch Überführung in Indigorot (Indirubin, Urorubin, Indigpurpurin). Auch das Indigorot ist im normalen Harn nicht präformiert. Bereits bei Besprechung des Indigblaus und seiner Darstellung durch Oxydation von Indoxyl ist die Tatsache erwähnt, daß neben Indigblau leicht Indigrot auftreten kann. In der Tat ist bewiesen daß das dem Indigblau isomere Indigrot durch langsame Oxydation aus dem Chromogen, dem Indoxyl, entsteht (*Maillard*). Es besteht daher die Möglichkeit, das Chromogen auch durch Überführung in Indigrot nachzuweisen.

Man erreicht diese für den qualitativen Indoxylnachweis allerdings wenig verwertbare Umwandlung durch Erwärmen des Harnes zum Kochen mit oder ohne Salzsäure (*Rosin*).

Darstellung des Indigorots aus Harn (*Rosin*[1]). Große Mengen indoxylreichen Harnes werden zu Portionen von 5 *l* mit Bleiessig gefällt. Aus den Filtraten wird ein Bleiüberschuß mit Salzsäure entfernt. Die vom Bleichlorid abfiltrierte Lösung wird mit Salpetersäure angesäuert (20 *cm*³ auf je 1 *l*) und gekocht. Ist eine dunkelrote Farbe eingetreten, so kühlt man schnell ab, stumpft die Reaktion mit Soda zu schwacher Acidität ab und filtriert die sich hierbei flockig abscheidenden Farbstoffe auf ein Filter ab. Der Filterrückstand wird mit Sodalösung und Wasser gewaschen und nach dem Trocknen am Rückflußkühler mit Chloroform extrahiert. Aus der blaugefärbten Lösung wird das Chloroform am Wasserbad abdestilliert, bis sich eine flockige Abscheidung einstellt. Diese sammelt man nach dem Erkalten der Flüssigkeit auf einem Filter. Der Filterrückstand wird mit kaltem Chloroform nachgewaschen, bis sich das ablaufende Chloroform eben rot färbt. Dann kocht man den Filterinhalt auf dem Wasserbad mit Äther aus, wobei das Indigrot in Lösung geht. Als Verdunstungsrückstand des Äthers hinterbleiben Kristalle, die nach ein- bis zweitägigem

[1]) *H. Rosin*: Über das Indigorot (Indirubin). *Virchows* Arch. **123**. 519 (1891).

Stehen in der ätherischen Mutterlauge aus Äther umkristallisiert werden.

Identifikation der blauen und roten Indigoharnfarbstoffe. Bisweilen begegnet man in frischen, häufiger in pathologisch veränderten Harnen (*Groeber*, *Wang* u. a.), auch im Schweiß, zersetztem Mageninhalt oder in Harnkonkrementen bereits fertig gebildetem Indigblau bzw. Indigrot. Zur Identifikation dieser Farbstoffe verfährt man folgendermaßen:

Für Indigblau: Man sammelt den meist ungelösten Farbstoff durch Filtration auf einem im Trichterhals liegenden Asbestpfropf (eventuell extrahiert man den Harn direkt mit Chloroform und verwendet den Chloroformrückstand) und reinigt ihn durch Waschen mit Wasser und Alkohol (der Alkohol löst hierbei das meist als Begleiter des Indikans vorhandene Indigrot), hierauf trocknet man bei mäßiger Temperatur und benutzt den Pfropf zu folgenden, für Indigblau charakteristischen Reaktionen.

Durch Erhitzen auf 300° bildet sich durch Sublimation ein purpurroter Dampf, der sich an den kalten Stellen des Gefäßes in Form von metallisch glänzenden Kristallen abscheidet. Die Kristalle zeigen im auffallenden Licht Kupferglanzfarbe, im durchfallenden Licht eine tiefblaue Färbung. Mit einer stark alkalischen Traubenzuckerlösung unter Abschluß von Luft (Einbringen des Pfropfes in eine bis zum Hals gefüllte Flasche) tritt Entfärbung ein (Bildung von Indigweiß). Beim Schütteln und an der Luft erfolgt unter Rückbildung des Indigotins wieder Blaufärbung.

Eine Lösung in Chloroform weist einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen *C* und *D* auf. Eine Lösung in konzentrierter Schwefelsäure (Bildung von Indigblaudi- und -monosulfosäure) zeigt gleichfalls einen Streifen zwischen *C* und *D*, der bei größerer Konzentration über *D* hinausreicht.

Auch die Alkalisalze der Sulfosäuren gehen beim Kochen mit Soda und Traubenzucker in die farblosen Indigweißsulfosäuren über, um sich beim Kontakt mit dem Luftsauerstoff wieder zu bläuen.

Für Indigrot. Man neutralisiert den Indigrot enthaltenden Harn mit Soda und nimmt den Farbstoff durch Ausschütteln in Äther auf (Trennung vom ätherunlöslichen Urorosein). Der Verdunstungsrückstand des Äthers wird qualitativ geprüft. In gleicher Weise wird auch der Rückstand der Alkoholwaschflüssigkeiten des Indigblaus (s. o.) geprüft.

Charakteristisch für Indigrot sind: Die Löslichkeit in Alkohol, die Entfärbung dieser Lösung beim Erwärmen mit Traubenzucker und Soda. Die Wiederfärbung im Kontakt mit der Luft, die Bildung

einer in Schwefelsäure löslichen Sulfosäure, der Absorptionsstreifen der alkoholischen Lösung im Grüngelb.

2. **Sogenannte Skatolfarbstoffe (Skatolrot).** Wohl fälschlicherweise hat man einen als Skatolrot bezeichneten Körper als ein Derivat einer hypothetischen, im Harn vermeintlich zur Ausscheidung kommenden Skatoxylverbindung gehalten. Durch *Maillard* und *Staal* ist diese Anschauung widerlegt, während *Porcher* und *Hervieux* an der Skatoxylprovenienz festhalten.

Die Violettfärbung des Chloroforms bei der Indikanprobe oder die spontane Rot- bis Violettfärbung des Harnes bei Salzsäurezusatz, die Kirschrotfärbung mit Salzsäure bzw. das Dunkeln beim Stehen an der Luft werden nicht durch Zersetzung einer fraglichen Skatoxylverbindung veranlaßt. Vielmehr sind andere Farbstoffe an diesen Farbenänderungen beteiligt. Das Skatolrot selbst ist in jüngster Zeit durch *Herter*[1]) als ein Indolderivat aufgeklärt, sein Chromogen war bereits vorher von *Staal* isoliert. Die Identität des Körpers mit dem Urorosein von *Nencki* und *Sieber* (s. d.) ist außerordentlich wahrscheinlich.

Nach *Pecker*[2]) sollen Skatolfarbstoffe die bei der *Heller*schen Ringprobe auftretende rotlila bis mahagonibraune Färbung sowie die Rotfärbung nach *Maranne* (Erhitzen bis fast Sieden von 5 cm^3 filtriertem Harn mit 10 bis 20 Tropfen HNO_3) verursachen.

Darstellung des Chromogens aus normalem Harn nach *Staal*[3]) (bzw. *Stokvis*). Der Harn wird mit Ammonsulfat gesättigt und nach maximaler Fällung aller Farbkomponenten filtriert. Das auf dem Wasserbad eingeengte Filtrat wird von ausgeschiedenem Ammonsulfat abgetrennt, mit Essigsäure angesäuert und mit Essigäther ausgeschüttelt. Durch Ausschütteln des Essigätherextraktes mit Wasser wird das Indikan beseitigt. Man setzt dieses Ausschütteln so lange fort, bis eine Probe des Wassers keine Reaktion mit Isatinsalzsäure mehr gibt. Hierauf entzieht man dem Essigäther das Skatolrotchromogen durch Ausschütteln mit Kalilauge und neutralisiertdie Lösung mit Essigsäure.

Eine Reindarstellung dieses Chromogens ist bis jetzt aus der wässerigen Lösung nicht geglückt. Hingegen gelingt eine Darstellung als Mg-Verbindung direkt aus dem Essigätherextrakt:

Man läßt den von Indikan befreiten Essigäther 24 Stunden lang unter zeitweiligem Umschütteln in einem Kolben mit $MgCO_3$

---

[1]) *C. A. Herter*: Über Indolessigsäure als Chromogen des Uroroseins des Harnes. Journ. of Biol. chem. **4**. 253 (1908).

[2]) *Henri Pecker*: Journ. Pharm. et Chim. (7.) **17**. 167 (1918).

[3]) *J. Ph. Staal*: Über das Chromogen des sogenannten Skatolrots im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**. 236 (1905).



stehen. Hierauf läßt man den Essigäther in einer Schale verdunsten und extrahiert den Rückstand mit 90%igem Alkohol. Das filtrierte Alkoholextrakt wird abermals zur Trockne verdunstet, der Rückstand nochmals mit 90%igem Alkohol aufgenommen, filtriert und wiederum eingedunstet.

Weder diese Mg-Chromogenverbindung noch das Chromogen des Alkaliextraktes (das durch beträchtliche Mengen von Hippursäure verunreinigt sein kann) sind bis jetzt als chemische Individuen erwiesen. Der Körper aber, der nach *Staal* keine gepaarte Schwefelsäure (bzw. Glykuronsäure) und kein Skatol enthält, ist dadurch ausgezeichnet, daß er mit Salzsäure und einem Oxydans (z. B. 1 bis 2 Tropfen 0·5%iges KNO_2) in einen Farbstoff übergeht, der in Äther und Chloroform unlöslich (Gegensatz zu Indigrot), in Amylalkohol löslich ist und dessen rote Farbe in saurem Wasser durch Alkali in Braun umschlägt, durch Zink entfärbt wird und beim Ansäuern bzw. durch Oxydation wiederkehrt. Die frische Farbstofflösung zeigt zwei Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E*.

Die Eigenschaften erinnern lebhaft an jene des Ururoseins (s. d.).

Darstellung des sogenannten **Skatolrots** aus Harn nach Skatolfütterung (*Grosser*[1]) bzw. Einspritzungen (*Porcher* und *Hervieux*[2]).

a) Qualitativer Nachweis: Harn der Skatolperioden (auch sicher indikanfreier Harn) wird mit zirka einem Zehntel seines Volumens Bleiessig gefällt, filtriert und mit dem gleichen Volumen Salzsäure versetzt. Nach einigen Stunden hat sich eine tiefrote Färbung gebildet. Der Farbstoff kann mit Amylalkohol gänzlich, mit Essigäther partiell extrahiert werden und zeigt die oben für den aus dem Chromogen dargestellten Farbstoff bereits aufgezählten Eigenschaften (vgl. bei „Urorosein"). Die Angaben von *Porcher* und *Hervieux* enthalten im wesentlichen die gleichen Daten.

b) Versuch einer Isolierung: Der Harn wird mit einem Achtel seines Volumens rauchender Salzsäure zum Sieden erhitzt, mit 200 *cm*³ heißer $BaCl_2$-Lösung versetzt und zehn Minuten gekocht. Nach 24 Stunden hat das sich abscheidende Bariumsulfat den Farbstoff niedergerissen. Das auf dem Filter gesammelte und mit heißem Wasser gewaschene Salz gibt den Farbstoff an heißen Alkohol. Die alkoholische Lösung wird ein-

[1]) *P. Grosser*: Über das Verhalten von zugeführtem Indol und Skatol im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**. 320 (1905).

[2]) *Ch. Porcher* und *Ch. Hervieux*: Untersuchungen über das Skatol. Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**. 486 (1905); vgl. L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en derivent. Schleicher frères. Compt. rend. de l'Acad. des sciences de Paris 1903. S. 138.



gedunstet und der Trockenrückstand zuerst mit Chloroform von Indikanbeimischungen gereinigt. Hieraut läßt man eine Extraktion mit Aceton folgen, wobei ein Anteil in Lösung geht, und gewinnt eine alkohollösliche und eine alkohol- und acetonlösliche Fraktion. Von diesen bisher nicht weiter erforschten Substanzen (oder Substanzmengen) scheint die alkohollösliche ein Skatolderivat zu sein; der Befund steht also in gewissem Gegensatz zu den Beobachtungen von *Staal*.

Nach den Beobachtungen *Herters*[1]) ist das farblose Chromogen des Uroroseins, das eine Indolessigsäure ist, zugleich die Muttersubstanz des sogenannten Skatolrots. Die Zugehörigkeit des aus ihm entstehenden Farbstoffes zu den Skatolderivaten wird immer dadurch vorgetäuscht, daß der farbige Körper aus der Indolessigsäure beim Erwärmen unter CO_2-Verlust Skatol liefert.

$$\text{(Indol)}-CH_2.COOH \longrightarrow \text{(Indol)}-CH_3 + CO_2.$$

(Ring-N jeweils mit N bezeichnet.)

B. Farbstoffe in Geweben. Pigmente.

Die Mehrzahl der intra- und extracellular gelegenen Gewebsfarbstoffe ist chemisch nicht aufgeklärt. Nur für eine beschränkte Anzahl ist durch qualitative Reaktionen eine Gruppenzugehörigkeit festgestellt. Wir stellen solche Substanzen an die Spitze dieses Absatzes.

I. Farbstoffe als Verwandte des Hämoglobins oder der Gallenfarbstoffe.

Histohämatine sind nach *Mc Munn*[2]) rote Farbstoffe, die sich bei einigen Spongien und Aktinienarten, ferner auch in Ovarien und im Verdauungstraktus von Seesternen (Uraster rubens) finden. Man gewinnt diese Körper durch Extraktion mit Kalilauge oder Alkohol und prüft die alkalischen oder sauren Lösungen spektroskopisch auf eine Ähnlichkeit der Spektralbilder mit jenen der Hämatin- bzw. Hämochromogenlösungen. Die Bilder, die in den Farbstofflösungen entstehen, zeigen nach Ammoniumsulfidzusatz Identität mit den Absorptionsstreifen des Hämochromogens, nach Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure mit jenen des Hämatoporphyrins.

[1]) *C. A. Herter*: Über Indolessigsäure als Chromogen des Uroroseins des Harnes. Journ. of Biol. Chemistry. Vol. **4**. 253 (1908); vgl. dazu *E. Salkowski* (Urorosein).

[1]) *C. A. Mc Munn*: Observations of the Chromatology of Actiniae. Proc. roy. Soc. **38**. 85 (1885); Phil. Trans. **176**. 641 (1885); On the chromatology of some british Sponges. Journ. of phys. **9**. 1 (1888); Proc. the Physiol. Soc. **11**. 12. (1887).

Selbstverständlich genügt die Identität beider Spektralbilder nicht, um eine chemische Identität beider Substanzen festzustellen. Es ist denkbar, daß es sehr verschiedenartige Körper vom Typus des Hämatins gibt.

Den Hämatinderivaten (Hämatoporphyrin) scheint auch der als **Turacin** bezeichnete rotviolette Farbstoff nahezustehen, der sich in den Flügelfedern von einigen Spezies der Musophagiden [*Church*[1]), *Gamgee*[2])] findet. Die Darstellung erfolgt durch Extrahieren mit Alkalien (vielleicht nicht ohne chemische Veränderung) und mehrfaches Umfällen mit Säuren. Der Körper erwies sich als kupferhaltig. Die Zugehörigkeit zu hämatinähnlichen Substanzen ist noch unbewiesen. Ein durch Kochen von Hämatoporphyrin mit kupferhaltigem Ammoniak entstehender Farbstoff zeigt dem Turacin ähnliche Eigenschaften (*Laidlow*[3]); auch läßt sich aus dem Turacin mit Säuren kupferfreies Turacoporphyrin gewinnen.

Gallenfarbstoffähnliche Farbstoffe bei niederen Tieren werden nach den für diese Körper gültigen Angaben extrahiert und identifiziert. Für Biliverdin verwendet man sauren Alkohol als Extraktionsmittel. Die *Gmelin*sche Farbenreaktion liefert ein Kriterium für die Gruppenzugehörigkeit dieser Substanzen. Den Gallenfarbstoffen nahestehend (d. h. durch eine positive *Gmelin*sche Probe ausgezeichnet) scheinen die Pigmente zu sein, die sich in den Flügeln mancher Schmetterlinge und Raupen (Vanessaarten) vorfinden (*v. Linden*[4]).

Man extrahiert diese Farbstoffe mit kaltem Wasser und fällt mit Alkohol. Der Niederschlag wird abermals in Wasser gelöst und kristallisiert in klinorhombischen Blättchen oder feinen Nadeln in gelbroter bis roter oder grüngelber Farbe. Der Körper ist eisenhaltig, gibt Eiweißreaktionen und reduziert.

II. Farbstoffe aus der Klasse der Purinkörper.

Am Aufbau gewisser Pigmente mancher (keineswegs aller) Lepidopterenarten (Kohlweißling, Citronenvogel aus der Klasse der Pieriden) ist die Harnsäure beteiligt [*Hopkins*[5]), *Griffiths*[6])].

[1]) *A. H. Church*: Untersuchungen über Turacin, ein tierisches, kupferhaltiges Pigment. I. II. Chem. News. **19**. 265 (1869); **65**. 218 (1892).

[2]) *A. Gamgee*: Über die Beziehung von Turacin und Turacoporphyrin zu den Blutfarbstoffen. Lancet. 11. Juni 1896; vgl. Proc. roy. Soc. **59**. 339 (1896).

[3]) *P. Laidlow*: Einige Beobachtungen über Blutpigmente. Journ. of phys. **31**. 464.

[4]) *M. Gräfin v. Linden*: Morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen über Pigmente der Lepitopteren. *Pflügers* Arch. **98**. 1 (1903).

[5]) *F. G. Hopkins*: The pigments of the Pieridae. Contribution to the study of excretory substances, with function in ornaments. Phil. Trans. Londen 1894. **186**. 661.

[6]) *A. B. Griffiths*: Recherches sur les couleurs de quelques insectes. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. **115**. 958 (1892); Chem. News. **66**. 305; Journ. chem. Soc. **64**. 236.

In dem Hauptpigment der Kapitelliden und in den Schuppen von Knochenfischen (Silbersubstanz) findet sich reines Guanin. Ohne Zweifel dürften noch zahlreiche andere Pigmente der Puringruppe angehören. Die Identifikation einer solchen Zugehörigkeit geschieht natürlich nach den für die Bestimmung der Purinkörper gültigen Maßnahmen.

Als Beispiel einer solchen Bestimmung sei das Verfahren von *Hopkins*[1]) für das weiße Pigment der Kohlweißlingflügel angeführt:

Die Flügel werden zuerst mit Alkohol und Wasser behandelt und dann einmal kurz mit Wasser aufgekocht. Hierauf behandelt man den Rückstand mit verdünntem Ammoniak oder stark verdünnter Sodalösung. Die klar filtrierte Lösung wird angesäuert, die Fällung mit Alkali gelöst und durch Umfällen mit Säure noch mehrfach gereinigt. Die Identität der Harnsäure muß durch Elementaranalyse, die Zugehörigkeit zur Puringruppe durch Murexidprobe erbracht werden.

Das gelbe Pigment des Citronenvogels (Gonopteryx rhamni) erwies sich gleichfalls als ein Körper, an dessen Aufbau die Harnsäure beteiligt ist. Da derselbe eine äußerst spezifische Eigenschaft, die Lepidoporphyrinbildung, zeigt, sei darüber kurz berichtet.

Die gelben Flügel werden zuerst mit Alkohol und mit kaltem Wasser extrahiert. Durch Auskochen des Rückstandes mit destilliertem Wasser entsteht eine gelbe Lösung, aus der sich der gelbe Farbstoff beim Abkühlen amorph abscheidet. Der Körper wird durch mehrfaches Umfällen mit Säuren aus seiner alkalischen Lösung gereinigt.

Die Gegenwart von Harnsäure wird durch die Murexidprobe in den Abdampfrückständen nach vorangegangener Hydrolyse mit kalter, konzentrierter Salpetersäure erbracht.

Elementarzusammensetzung des gelben Pigmentes: C 38·13, H 3·47, N 37·11, O 21·29%.

Lepidoporphyrinreaktion. Der gelbe Farbstoff verwandelt sich beim Erwärmen mit 20%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbad in einen purpurroten Körper, der auch in konzentrierter Schwefelsäure löslich ist und beim Verdünnen oder Neutralisieren seiner stark sauren Lösung flockig ausfällt.

III. Farbstoffe aus der Gruppe der Lipochrome.

Lipochrome sind gelbe bis orangerote und rote Substanzen, die in der niederen und höheren Tierwelt weit verbreitet sind. Ihr chemischer Aufbau ist ganz unaufgeklärt, ihre Charakteristik beruht nur auf der Feststellung gemeinsamer Klassenmerkmale.

[1]) *F. G. Hopkins*: Pigments of Lepidoptera. Nature. **45**. 581 (1892).

Da nur diese die Grundlagen für eine Isolierung wie eine Identifikation eines Körpers als „ein Lipochrom" bilden, so seien sie kurz angeführt:

Reine Lipochrome sind unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Ölen und Fetten.

Die Lösungen sind gelb bis rot gefärbt, bleichen aber an der Luft (Sauerstoffkontakt) und im Licht. Charakteristisch und zur Reinigung und Trennung von Lipoiden verwertbar sind die Verbindungen dieser Körper mit Alkalien und Erdalkalien (Seifen), welche stabil und in der Hitze nicht zersetzlich sind.

Diese Alkaliverbindungen sind ferner löslich in Äther und Petroläther, unlöslich in Alkohol und Alkalien, so daß sie von den erstgenannten Solvenzien aus anderen Lösungen aufgenommen werden. Die Lösungen in Chloroform sind gleichfalls sehr stabil. Aus ihnen geht der Farbstoff nicht in eine Alkalilösung über (Gegensatz zu Bilirubin).

Zur Identifikation dient das Verhalten der Spektralerscheinungen und der Färbung durch konzentrierte Säuren. Alle Lipochrome zeigen zwei oder drei Absorptionsstreifen im blauen und violetten Teil des Spektrums, in Alkoholätherlösung liegt ein Streifen in der Nähe der Linie *F*, weiter nach *G* als *b* reichend, ein zweiter Streifen zwischen *F* und *G*.

Mit konzentrierter Salpetersäure oder Schwefelsäure entstehen blaue, blaugrüne, zuletzt violette bis gelbfahle Färbungen.

Darstellung. Nicht alle Lipochrome sind bisher in kristallisierter Form isoliert worden.

Die Unkristallisierbarkeit ist aber in der Verunreinigung dieser Substanzen mit kristallisationshemmenden Beimengungen (Lipoiden, Fetten, Phosphatiden) und nicht in einer elementaren Wesensdifferenz begründet.

Das lipochromhaltige Material (gelb gefärbte Organbestandteile) wird zuerst bei niederer Temperatur getrocknet und zu einem feinen, rot oder gelb gefärbten Pulver zerrieben. Ist das Substrat kalkhaltig (z. B. Crustaceenpanzer), so kann man eine Entkalkung durch verdünnte Mineralsäure vorangehen lassen. Gelingt das Trocknen nicht, so können auch die fein zerteilten Protoplasmateile verarbeitet werden. Alle derartigen vorbereitenden Manipulationen bezwecken ja nur eine Erleichterung der folgenden Extraktionen und müssen von Fall zu Fall variiert werden. Ebenso lassen sich auch für die Wahl des Extraktionsmittels keine generellen Regeln geben. Am meisten gebräuchlich ist die Verwendung von heißem absoluten Alkohol oder von Alkoholäther zu gleichen Teilen oder von Chloroform. Auch Äther und Petroläther allein sind verwendbar. Es entstehen dann meist rote Lösungen, bisweilen auch gelbe

Lösungen, z. B. ist die Alkohollösung des Crustaceorubins rot, jene in Benzol oder Äther gelb. Dabei sind die in Lösung befindlichen Körper identisch.

Zu präparatorischen Zwecken verfährt man dann so: Man überläßt eine Probe der Extraktionslösung der Verdunstung, um auf die Möglichkeit der Spontanabscheidung in Kristallform zu prüfen. Eine solche gelingt eben dann, wenn das richtige Extraktionsmittel gewählt ist, z. B. das Lipochrom der Flagelate: Euglena sanguinea aus Alkohol (*Kutscher*[1]) oder das Crustaceorubin aus Panzern von Hummer aus Alkoholäther (*Pouchet*[2]) oder Lutein aus Aceton bzw. Petroläther. Hinterbleibt aber eine fettige Masse, die Lipoide oder Cholesterin enthält, so wird die etwas eingeengte alkoholische Lösung durch Zusatz von Kali am Rückflußkühler geraume Zeit gekocht (zur Verseifung von Fetten). Aus der Lösung vertreibt man den überschüssigen Alkohol. Der Rückstand der Alkalilipochromverbindung wird nun mit Kochsalz gesättigt und mit Äther oder Petroläther ausgeschüttelt. Beide Solvenzien sind zu prüfen, da bisweilen der Petroläther versagt. Der Petrolätherrückstand wird mit Säure behandelt und das freie Lipochrom in Alkohol oder Äther oder Schwefelkohlenstoff aufgenommen. Auch hier wende man möglichst viele Solvenzien an, um eine Kristallisation zu ermöglichen. Ist man gewiß, daß außer dem Lipochrom kein anderer gelber Farbstoff in das erste alkoholische Extrakt übergegangen ist, so kann man den Rückstand dieses Extraktes auch mit Sodalösung kochen. Durch Säurezusatz wird der Reinfarbstoff als wasserunlöslich gefällt und dann mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff ausgeschüttelt.

Zur Identifikation dienen die eingangs erwähnten Reaktionen. Nach dieser prinzipiell skizzierten Methode sind Lipochrome bei Protozoen, Spongien, Cölenteraten, Echinodermen, Würmern, Mollusken, Crustaceen, Insekten, Kaltblütern und Warmblütern isoliert worden.

Crustaceorubin und Cyanokristallin der Panzer von Crustaceen.

Beide Substanzen sind Lipochrome. Der letztere geht beim Kochen, Erwärmen oder Behandeln mit Säure in den ersteren über.

Er findet sich auch in reichlicher Menge in der Hypodermis vor.

---

[1]) *F. Kutscher*: Beitrag zur Kenntnis der Euglena sanguinea. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 360 (1898).

[2]) *G. Pouchet*: Sur le changement de coloration provoqués expérimentalement chez les Crustacées. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. **74**. 757 (1872); Journ. d'Anat. et de Physiol. **12**. 10 (1876).



Die Kristallisation des Crustaceorubins gelingt leicht durch Extraktion mit Alkoholäther zu gleichen Teilen und Verdunsten [*Pouche*[1]), *Krukenberg*].

Nach *Verne*[2]) gleicht das Crustaceorubin dem pflanzlichen Carotin (C : H = 5 : 7) und besitzt die Bruttoformel $C_{40} H_{56}$. Es gibt mit Jod eine violettbraune Additionsverbindung und zeigt mit Schwefelsäure Blaufärbung.

Das labile Cyanokristallin wird ohne Verwandlung dem schwarzblauen, von der Hypodermis getrennten Hummerpanzer mit Wasser entzogen, wenn nur die Konzentration der entkalkenden Salzsäure (0·1 %ig) so gewählt ist, daß keine überschüssige, freie, von Kalk nicht neutralisierte Säure vorhanden ist. In diesem Fall gewinnt man eine blaue Lösung, die sich beim Erwärmen über violett allmählich rot färbt (unter Umwandlung in Crustaceorubin). Ein geeignetes Extraktionsmittel stellt auch eine verdünnte Ammoniumchloridlösung dar (0·1%), aus welcher der Farbstoff in Form blauer Flocken durch Sättigen mit Ammonsulfat ausgesalzen wird. Die Flocken sind auf dem Filter leicht zu sammeln und in Alkohol und Äther mit einer burgunderroten Farbe löslich (*Marion Newbigin*[3]).

Tetronerythrin. Mit diesem Namen bezeichnet man ein Lipochrom, das als roter Farbstoff in der sogenannten „Rose“ der Vögel aufgefunden wurde, und dann auch im Krabbenblut (*Jolyet* und *Regnard*) und im Crustaceenblut (*Halliburton*[4]) beschrieben wurde.

Das tetronerythrin- und zugleich hämocyaninhaltige Blut der Crustaceen wird mit einer überschüssigen Menge Alkohol versetzt. Das Filtrat der entstehenden Eiweißfällung wird durch Eindampfen auf dem Wasserbad von Alkohol befreit. Beim Einengen scheidet sich das wasserunlösliche Lipochrom in Form von roten Flocken ab, die auf dem Filter gesammelt und in Alkohol oder Äther gelöst werden. Eine Kristallisation ist bis jetzt nicht gelungen.

Bisweilen gehen bei den geschilderten Extraktionen lipochromhaltiger Organe zwei Lipochrome in Lösung, deren Trennung gelingen kann. Ob es sich um Modifikationen eines einheitlichen Körpers oder physiologische Zwischenstufen zweier verschiedener Körper handelt, ist nicht entschieden. Die Trennung solcher Fraktionen gelang für einen roten Farbstoff von Copepoden (Diaptomus

[1]) *G. Pouchet*: Sur le changement de coloration provoquées expérimentalement chez les Crustacées. Compt. rend. de l'Acad. de Sciences. **74.** 757 (1872); Journ. d'Anat. et de Physiol. **12.** 10 (1876).

[2]) *J. Verne*: Compt. rend. Soc. de Biol. **83.** 963 (1920).

[3]) *Marion Newbigin*: The pigments of decapod Crustacea. Journ. of Phys. **21.** 237 (1897).

[4]) *W. D. Halliburton*: On the blood of decapod Crustacea. Journ. of Phys. **6.** 300 (1885).

bacillifer) (*Zopf*[1]) und für das Vitellolipochrom aus Eiern der Seespinne (Maja squinado) (*Maly*[2]). Die Fraktionierungsversuche sind in beiden Fällen verschieden und hier einer Erwähnung wert.

Für **Copepoden**: Man extrahiert mit kochendem Alkoholäther. Aus dem Extrakt vertreibt man den Äther durch Erwärmen und verseift die Alkohollösung nach Zusatz von Natronlauge. Hierauf entfernt man den Alkohol auf dem Wasserbad und salzt die Seife durch Sättigen mit Kochsalz aus. Die sich in Form von tiefroten Massen abscheidende und obenauf schwimmende Masse wird mit Äther, Petroläther oder Schwefelkohlenstoff extrahiert, wodurch ein „gelbes Carotin" in Lösung geht. Der Seifenrückstand wird angesäuert und gibt nun an Äther ein „rotes Carotin". Beide Körper sollen Verschiedenheiten der Spektralstreifen aufweisen. Die Lipochromreaktionen zeigt nur das „rote Carotin" (Diaptomin) vollkommen.

Für **Vitellolipochrome** niederer Tiere (*Maly*):

Die rotgefärbten Dotterträubchen der Seespinne werden bei 30 bis 40° getrocknet, die trockene Masse wird zu einem Pulver zerrieben und mit absolutem Alkohol extrahiert. Der heiße alkoholische Auszug wird mit heißem Barytwasser gefällt. Es entsteht ein Niederschlag der Barytverbindung des Vitellorubins. Derselbe wird noch heiß auf dem Filter gesammelt, mit Alkohol gewaschen und mit verdünnter Salzsäure zerlegt. Es kommt hierbei zur Abscheidung einer rot gefärbten, wasserunlöslichen Masse, die zugleich mit unlöslichen Fettsäuren auf der Flüssigkeit schwimmt Dieselbe wird abgeschöpft und feucht mit Magnesia usta innig verrieben. Die so gewonnene Masse wird erst mit kaltem Alkohol gewaschen und dann mit Äther oder Chloroform extrahiert. Die rot gefärbte Lösung wird mit Alkohol gefällt. Das gefällte Magnesiumsalz wird mit Salzsäure zersetzt und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand stellt das reine Lipochrom dar. Das Vitellolutein, dessen Bariumsalz in Wasser löslich ist, wird in dem Filtrat der ersten Barytlösung mit Salzsäure in Freiheit gesetzt und mit Ligroin extrahiert.

Beide Körper scheinen verschieden zu sein. Nur das Vitellorubin erfüllt alle Lipochromeigenschaften, da es im Gegensatz zu dem Vitellolutein die Verbindung mit Alkalien und alkalischen Erden eingeht.

Vitellorubin zeigt einen breiten Absorptionsstreifen bei *F*, Vitellolutein zwei Streifen, der eine bei *F*, der andere zwischen *F* und *G*.

---

[1]) *W. Zopf*: Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Tiere. Leipzig. 3. H. Über Produktion von carotinartigen Farbstoffen bei niederen Tieren. S. 26 (1893).

[2]) *R. Maly*: Über die Dotterpigmente. Monatsh. f. Chem. 2. 18 (1881).



Die oben geschilderte Darstellungsmethode dürfte auch für andere Lipochrome erfolgreich anwendbar sein.

Lipochrome der Säugetiere werden auch als **Luteine** bezeichnet. Sie sind die Träger der gelben Farbe so mancher Gewebe und finden sich im Fettgewebe, im Eigelb, im Blutserum[1]) und im Corpus luteum. Eine Reindarstellung dieser Körper ist bis jetzt nur für das Lutein der Corpora lutea der Kuh, und zwar in Kristallform gelungen. Die Isolierung einheitlicher Körper ist hier vor allem durch den Reichtum an Fetten oder Lipoiden gestört, die sich kaum oder nur schwer beseitigen lassen.

Ein Lipochrom, das sich im Blutserum der Kuh findet, soll nach *Palmer* und *Eckles*[2]) ein Gemisch aus Carotin und Xanthophyll (aus der Nahrung stammend) und als sogenanntes Carotoalbumin mit Serumprotein verbunden sein.

Das Lutein des Eidotters haben *Willstätter* und *Escher*[3]) rein dargestellt und untersucht; sie fanden, daß es nach Zusammensetzung und Eigenschaften nur mit Ausnahme seines Schmelzpunktes mit dem Xanthophyll übereinstimmt (Xanthophyll Schmelzpunkt korr. 173·5 bis 174·5°, Lutein Schmelzpunkt korr. 195 bis 196°).

Aus 6000 Hühnereiern (= 110 *kg* Dotter) wurden 4 *g* Rohprodukt des Farbstoffes gewonnen. Nach Koagulation der Dotter durch Alkohol wurde die krümelige Masse mit Aceton extrahiert (2 *hl*), aus dem beim Stehen 2·25 *l* Öl abgeschieden wurden. Lecithin und Cholesterin wurden durch Überführen in eine konzentrierte petrolätherische Lösung und Ausfällen mit neuem Aceton beseitigt.

Aus der von allen Phosphatiden befreiten Petrolätherlösung (verdünnt) kristallisierte beim Stehen in der Kälte das (schwer filtrierbare) Rohlutein in haarfeinen verfilzten hellroten Nädeliten. Mehrfaches Umkristallisieren aus siedendem Methylalkohol lieferte das reine Produkt (bräunlichgelbe kompakte Prismen). Die Analysen lieferten Werte, die auf die Bruttoformel $C_{40} H_{56} O_2$ des Xanthophylls stimmten; ebenso gab die Molekulargewichtsbestimmung den identischen Wert.

---

[1]) Unter anderen *L. Zola*: Über die Gegenwart von Bilirubin und Lutein im menschlichen Serum. Real. Istit. Lombardo de scienze e lettere. (2.) **27**. 839 (1904).

[2]) *Leroy S. Palmer* und *C. H. Eckles*: Journ. of biol. Chem. **17**. 191, 211, 223, 237, 245 (1914).

[3]) *Richard Willstätter* und *Heinr. H. Escher*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**. 214 (1911). Dort auch die ältere Literatur. Vgl. ferner *Cesare Serono*: Arch. di Farm. sperim. **14**. 509 (1912); über Serumlipochrom vgl. ferner: *A. A. Hijmans van den Bergh* und *P. Muller*: Biochem. Zeitschr. **108**. 279 (1921); über das Lipochrom der „Xanthose": *H. Salomon*: Wiener klin. Wochenschr. **32**. 495 (1919); über Chromolipoide: *C. Ciaccio*: Biochem. Zeitschr. **69**. 313 (1914).

IV. Farbstoffe aus der Gruppe der Melanine.

In dieser Gruppe faßt man eine Anzahl schwarzer oder schwarzbrauner Körper zusammen, die bei Wirbeltieren und Wirbellosen unter normalen und pathologischen Bedingungen vorkommen. Die Zusammengehörigkeit der schwarzen Pigmente zu einer einheitlichen Gruppe ist nicht allein durch das Farbenmerkmal, sondern auch durch die höchstwahrscheinliche generelle Übereinstimmung ihrer Zusammensetzung aus zyklischen, dem Eiweißmolekül entstammenden Komplexen (Pyrrol, Tryptophan) gerechtfertigt. Sie entstehen zum Teil aus farblosen Chromogenen, die ebensolche aromatische und heterozyklische Eiweißderivate sind und bei ihrer meist fermentativen Umwandlung in Melanine unter gewissen Bedingungen auch akzessorische Gruppen (S- oder Fe-haltige Komplexe oder auch verzweigte aliphatische Ketten) in diesen Umwandlungsprozeß durch Kondensation einbeziehen können.

Fürth und *Lieben*[1]) haben vorgeschlagen, den Namen „Melanoidine" — gegenüber den natürlichen „Melaninen" — für Umwandlungsprodukte des Tryptophans, die Benennung „Humine" für solche der Kohlehydratkomplexe anzuwenden.

Die Darstellung reiner Melanine ist wegen ihrer Unlöslichkeit in indifferenten Lösungsmitteln eine schwierige. Die Schwierigkeit wird erhöht durch die nur schwer zu beseitigende Anwesenheit von Eiweißbeimischungen und die relative Labilität der Melanine gegen Alkali.

Man hat früher im Prinzip zwei Darstellungsmethoden eingehalten: Im einen Fall hat man die schwarzen Pigmente durch Behandeln mit kalter oder warmer Lauge in Lösung gebracht und so von Eiweißkörpern getrennt. Eine Reinigung hat man alsdann durch wiederholtes Umfällen der Melanine mit Säuren aus alkalischer Lösung zu erzielen versucht. Im anderen Fall hat man die säureunlöslichen Körper dadurch vom Eiweiß befreit, daß man die pigmenthaltigen Gewebsbestandteile durch Hydrolyse mit starken Säuren vom Eiweiß trennte, eventuell die Säurehydrolyse der Proteine mit einer Fermenthydrolyse (Pepsin, Trypsin) kombinierte und so einen in Säuren unlöslichen Pigmentrückstand gewann. Diesen Rückstand hat man schließlich zur Reinigung mit Alkali behandelt und durch Umfällen mit Säure gereinigt.

Schon die Vergleichung von Analysenzahlen der nach beiden Methoden dargestellten Präparate hat keine restlose Übereinstimmung dieser Körper gezeigt. Die Differenzen werden dadurch erklärt, daß die Mehrzahl der Melanine offenbar durch die Behandlung mit Alkali eine Veränderung ihrer Zusammensetzung erleidet. Das

[1]) *Otto Fuerth* und *Fritz Lieben*: Biochem. Zeitschr. **116**. 224 (1921).

genuine Melanin geht hierbei in eine alkalilösliche „Melaninsäure“ über, die andere Zusammensetzung aufweist. Mit Rücksicht darauf ist ein Vergleich aller dargestellten Melanine, die bald mit, bald ohne Verwendung von Alkalibehandlung dargestellt sind, unstatthaft.

Wir sehen daher an diesem Ort davon ab, alle Methoden der Darstellung, die für schwarze Pigmente der verschiedensten Herkunft von den verschiedenen Autoren angewandt sind, detailliert zu besprechen. [Eine Zusammenstellung der älteren Arbeiten findet sich bei *v. Fürth*[1]) und bei *v. Fürth* und *Jerusalem*[2]), vgl. auch S. 731, Note 2]. Wir begnügen uns vielmehr, für eine Darstellungsmethode einige Beispiele zu geben, die eine allgemeine Anwendung mit dem Resultat relativ reiner Endprodukte gestatten.

Vorbereitungen: Bei der Isolierung von Melaninen aus tierischen Geweben werden diese zuerst zur Befreiung von Fetten einer Extraktion mit Alkohol und Äther unterworfen.

I. Methoden der mechanischen Isolierung (anwendbar für das Chorioidealpigment).

Aus der Chorioidea des Auges[3]). Man eröffnet frische Rinderaugen durch einen Scherenschlag, teilt dann das Auge in zwei Hälften und entfernt die Glaskörperteile durch leichtes Schwenken unter Wasser. Hierauf entfernt man unter Wasser durch Auspinseln mit einer Federfahne oder durch gelindes Reiben mit einem armierten Glasstab die Pigmentkörnchen aus den dunkel gefärbten Teilen der Augenhäute.

Hierbei wird der größere Teil des Pigmentes, besonders der Anteil des Corpus ciliare in Wasser aufgeschwemmt; nur sehr langsam setzt sich das Pigment zu Boden. Die vereinigten tiefschwarzen Flüssigkeiten werden durch ein Seidenfilter geschickt. Durch Zusatz des gleichen Volumens einer auf 80° erwärmten gesättigten Ammonsulfatlösung und längeres Erwärmen auf dem Wasserbad wird das Pigment ausgeflockt, so daß es sich zu Boden senkt.

Ein nicht unbeträchtlicher Pigmentanteil läßt sich aus der Chorioidea bulbi nicht herauspinseln. Um ihn zu gewinnen, zieht man die Chorioidea mitsamt der Retina von dem Bulbus ab, zerkleinert die Gewebsfetzen fein und unterwirft die ganze Masse einer mehrtägigen Verdauung mit Pepsinsalzsäure und dann mit Trypsin. Hierbei scheidet sich das Pigment zuletzt in feinen

[1]) *O. v. Fürth*: Physiologische und chemische Untersuchungen über melanotische Pigmente (Sammelreferat). Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. **15**. 617 (1904).

[2]) *O. v. Fürth* und *E. Jerusalem*: Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. *Hofmeisters* Beitr. **10**. 131 (1907) (Literatur).

[3]) *E. Landolt*: Über die Melanine der Augenhäute. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 407 (1899).

Körnchen am Gefäßboden ab. Durch Dekantieren und langdauerndes Waschen mit Wasser, Abschleudern in der Zentrifuge und schließliches Nachbehandeln mit Alkohol und Äther gewinnt man ein hellbraunes, staubfeines Pulver. Eventuell wiederholt man an diesem die Trypsinverdauung oder auch die genannte Reinigung durch Umfällen aus Alkalilösung mit Säure.

II. Methode der Säurehydrolyse (anwendbar für Hippomelanin melanotischer Drüsen des Pferdes oder melanotischer Tumoren anderer Herkunft nach *v. Fürth* und *Jerusalem*[1]).

Die Methode führt zu unverändertem Pigment.

Frische, melanotische Lymphdrüsentumoren von Schimmeln werden von anhaftendem Gewebe befreit und bis zu ihrer Verarbeitung in Alkohol aufbewahrt. Die zerkleinerte Tumorenmasse wird alsdann mit konzentrierter, rauchender Salzsäure zerkocht. Die Pigmentkörner bleiben hierbei vollkommen ungelöst und werden nach Wasserzusatz zu der Hydrolysenmischung auf einem gehärteten Filter gesammelt und durch Waschen mit Wasser von löslichen braunen Bestandteilen befreit. Hierauf wird nochmals mit kochender rauchender Salzsäure extrahiert, abfiltriert, mit Wasser verrieben und ausgekocht, dann abermals abgesaugt, hierauf wird mit heißem siedendem Alkohol und Äther extrahiertund getrocknet.

Das so dargestellte Produkt ist sicher von dem Phymatorhusin von *Nencki* und anderen Autoren verschieden, da es in Alkalilauge ganz unlöslich ist. Dadurch ist es auch von den „Melanoidinsäuren" aus Eiweiß zu unterscheiden. Der Körper geht in eine alkalilösliche Modifikation (Melaninsäure) erst durch eine mehrstündige Behandlung mit der sechs- bis zehnfachen Menge Ätzkali über. Er gewinnt dann die Eigenschaften jener Melanine, welche z. B. *Nencki*, *Berdez* und *Sieber* als Hippomelanin dargestellt haben. Es muß daher für alle älteren Präparate geschlossen werden, daß sie erst durch sekundäre Veränderung der Zellpigmente entstanden sind.

III. Methoden der Alkalihydrolyse und Alkaliextraktion (anwendbar für Melanine der Haare, der Haut (*Abel* und *Davis*[2]), melanotische Tumoren [Phymatorhusin von *Nencki*[3]), *Zumbusch*[4]) u. a.].

---

[1]) *O. v. Fürth* und *E. Jerusalem*: Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. *Hofmeisters* Beitr. **10**. 131 (1907).

[2]) *J. Abel* und *W. S. Davis*: On the pigments of the negros skin and hair. Journ. of exper. Med. **1**. 361.

[3]) *Berdez* und *M. Nencki*: Über die Farbstoffe melanotischer Sarkome. Arch. f. (exper. Pharm. u. Path.) **20**. 346 (1886); *M. Nencki* und *N. Sieber*: Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Ibid. **24**. 17 (1887).

[4]) *L. v. Zumbusch*: Beiträge zur Charakteristik des Sarkomelanins vom Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**. 511 (1902).

Darstellung aus Haaren nach *Spiegler*[1]). Große Mengen Roßhaar (5 *kg*) werden mit 0·5%iger Sodalösung gewaschen und sodann mit der fünffachen Menge 5%iger Kalilauge bis zu ihrer Lösung gekocht. Nach etwa vier Stunden wird das Pigment aus der erkalteten Lösung durch einen großen Überschuß von konzentrierter Salzsäure als eine teigige, sich am Boden bald absetzende Masse gefällt. Durch Kolieren wird diese Masse von der Flüssigkeit getrennt, mit Wasser und verdünnter Salzsäure gut gewaschen und schließlich nochmals zur Befreiung von Eiweißresten acht bis zehn Stunden mit 5%iger Salzsäure auf dem Sandbade unter Rückflußkühlung gekocht. Hierauf filtriert man noch heiß und trocknet den feinen braunen Filterrückstand in einer Schale auf dem Wasserbad.

Zur weiteren Reinigung verreibt man den trockenen Körper in einer Reibschale mit konzentriertem wässerigen Ammoniak. Die tiefbraune abfiltrierte Lösung wird mit Salzsäure gefällt, der ausfallende Pigmentkörper abfiltriert. Lösen und Fällen wird ein zweites und drittes Mal wiederhoit. Die letzte Fällung wird auf dem Filter gesammelt, auf dem Wasserbad und im Toluolbad getrocknet und dann zu einem feinen Pulver zerrieben. Hierauf löst man durch Zerreiben in konzentrierter Schwefelsäure, filtriert über Glaswolle und scheidet das Pigment durch Eingießen der Filtrate in viel kaltes destilliertes Wasser ab. Den pulverigen Niederschlag wäscht man bis zur Schwefelsäurefreiheit der Waschflüssigkeiten und trocknet dann. Die Umfällung aus konzentrierter Schwefelsäure wird ein zweites Mal wiederholt. Zur Befreiung von elementarem Schwefel wird schließlich das trockene Pigment aufeinanderfolgend mit Alkohol, reinem Schwefelkohlenstoff und Äther extrahiert.

Elementarzusammensetzung:

aus Pferdehaar C 60·36, H 5·80, N 11·26, S 3·22;
aus Schafwolle „ 50·91, „ 6·15, „ 10·21, „ 2·91.

Für ein „Keratomelanin" fand *Strauss*[2]) folgende Werte:

C 61·08, H 5·51, N 11·57, S 2·72%.

Aus Negerhaut isolierte *Young*[3]) ein Melanin von folgender Zusammensetzung:

C 60·12, H 6·7, N 11·89, S . Fe 0·21%.

---

[1]) *E. Spiegler*: Über das Haarpigment. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. **4**. 40 (1904). Vgl. ferner *Ross Aiken Gortner*: Bull. Soc. Chim. de France. (4.) **11**. 498 (1912); Journ. Amer. Chem. Soc. **35**. 1262 (1913).

[2]) *E. Strauss*: Studien über Albuminoide. Heidelberg 1904, *Winter*, S. 103.

[3]) *W. John Young*: Biochem. Journ. **8**. 460 (1914).

Ein farbloses Chromogen (Pigmentsäure) läßt sich in analoger Weise aus Schimmelhaaren und weißer Schafwolle darstellen (*Spiegler*). Die Darstellung gleicht der vorgenannten, nur darf das nur grau gefärbte Pigmentpulver nicht mit Ammoniak behandelt werden, da es sich hierbei ganz schwarz färbt. Man reinigt daher diesen Körper nur durch Ausfällen mit viel Wasser aus der Lösung in konzentrierter Schwefelsäure. Das hierbei frisch gefällte Pulver ist nahezu weiß, nimmt aber nach längerem Stehen eine dunklere, graue Färbung an.

Elementarzusammensetzung:

aus Schimmelhaaren C 48·51, H 7·06, N 12·58, S 2·80%,
aus Schafwolle „ 55·45, „ 7·38, „ 10·87, „ 2·30%.

Die Darstellungsmethoden aus Haarpigment, welche unter anderem von *Sieber* und von *Abel* und *Davis*[1]) verwendet wurden, führen zu anderen Pigmenten inkonstanter Zusammensetzung (s. o.).

Aus Negerhaare C 52·74, H 3·53, N 10·51 (*Abel* und *Davis*).

Exakte Pigmentstudien über Federnpigmente von Vögeln liegen nicht vor (*Krukenberg*).

Darstellung von Phymatorhusin (*Berdez* und *Nencki*[2]) aus melanotischen Geschwülsten des Menschen.

Das fein zerhackte melanotische Tumorgewebe wird ausgiebig mit heißem 93%igen Alkohol und dann mit Äther und der trockene Gewebsrückstand mit 1%iger Kalilauge im vierfachen Gewicht extrahiert. Die Extrakte werden abgegossen und die noch gefärbten Gewebsreste mehrfach wiederholt mit der Laugenlösung behandelt. Die filtrierten vereinigten Lösungen werden mit Salzsäure gefällt. Der flocklg ausfallende Farbstoff wird abfiltriert und auf dem Wasserbad (nachdem er vorher vom Filter abgelöst ist) getrocknet. Dann folgt ein Extrahieren mit kalter 1%iger Kalilauge, erneutes Fällen, Auswaschen und Trocknen und zur Beseitigung von Eiweißresten eine zwei- bis dreistündige Hydrolyse mit kochender 10%iger Salzsäure in 20facher Menge. Der ungelöste Rückstand wird dann säure- und chlorfrei gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und bei 110° getrocknet. (Diese Methode ist auch für Chorioidealpigment und für Hippomelanin anwendbar.)

Darstellung von Pigment aus Melanosarkom (*Zumbusch*, *Wolff*) durch kombinierte Proteolyse und Sodaextraktion.

---

[1]) *J. Abel* und *W. S. Davis*: On the pigments of the negros skin and hair. Journ. of exper. Med. **1**. 361.

[2]) *Berdez* und *M. Nencki*: Über die Farbstoffe melanotischer Sarkome. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. **20**. 346 (1886); *M. Nencki* und *N. Sieber*: Weitere Beiträge zur Kenntnis der tierischen Melanine. Ibid. **24**. 17 (1887).

Wir geben die Methode von *Wolff*[1]) wieder, die im Prinzip einer älteren Methode von *Brandl* und *Pfeiffer* folgt. Gerade aus den folgenden Daten geht hervor, wie weit die Anwendung von Alkalien (Soda oder Ätzkali) Veränderungen hervorruft. Andrerseits geht daraus auch hervor, daß genuine Melanine schon a priori eine verschiedene Alkaliresistenz besitzen und daß die Verschiedenheit der Elementarzusammensetzung auch von der Methode unabhängig sein kann.

Die gut zerkleinerte Leber wird mit Pepsinsalzsäure bei Brutschranktemperatur behandelt; die Pepsinlösung wird so oft durch Dekantieren und Wiederzusatz neuer Lösung gewechselt, als noch Albumosen in Lösung nachweisbar sind. Der zuletzt mit Wasser gut gewaschene schwarze Rückstand wird so lange mit 8%iger Sodalösung extrahiert, bis die Extrakte farblos ablaufen.

Aus den gesammelten Filtraten wird das Melanin mit Essigsäure gefällt und durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigt, zuletzt bei 110° getrocknet (Präparat A). In einem Fall kann nun die Gesamtheit des vorhandenen Pigmentes in Lösung gehen, in anderen Fällen bleibt ein beträchtlicher sodaunlöslicher Rückstand. Dieser wird mit 5%iger Natronlauge bei 50- bis 60° gelöst und aus dem Filtrat dieses Extraktes mit Salzsäure (nicht fällbar durch Essigsäure) gefällt. Die Fällung wird nun durch Lösen in Sodalösung (in der dieser Körper jetzt wieder löslich geworden ist) und Fällen mit Essigsäure wie oben gereinigt (Präparat B).

Zusammensetzung von

A: C 48·68, H 6·00, Fe 2·63, S 2·51, N 9·75, Asche 3·24%,
B: „ 50·59, „ 5·92, „ — (Spur), „ 10·24, „ —

Präparat eines Tumormelanins, dessen Acetat in Soda löslich war:

C 57·28, H 5·41, Fe —, S 1·67, N 9·34%.

Brahn und *Schmidtmann*[2]) geben folgende Analysen:

a) Tumormelanin: C 51·92, H 5·21, N 11·03, S 3·42%,
b) Melanoidin aus Horn: C 52·85, H 5·91, N 10·04, S 5·41%,
c) „Abnutzungspigment" aus Herz und Leber: C 50·40, H 5·94, N 10·08, S 3·25%.

Salkowski[3]), der das Melanin aus melanotischen Därmen in ähnlicher Weise isolierte, empfiehlt zur gründlichen Entfernung von Eiweiß und Fetten das Auskochen mit Essigsäure.

---

[1]) *H. Wolff*: Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente. *Hofmeisters* Beitr. **5**. 476 (1904). (Literatur!)

[2]) *B. Brahn* und *M. Schmidtmann*: *Virchows* Arch. **227**. 137 (1920).

[3]) *E. Salkowski*: *Virchows* Arch. **227**. 121 (1920) und **228**. 468 (1921); vgl. dazu *E. Abderhalden*: Zeitschr. f. physiol. Chem. **78**. 159 (1912); **85**. 92 (1913).

Zusammenfassend sei hier noch einmal darauf hingewiesen, daß die Anwendung von Alkalien bei der Melanindarstellung (also z. B. bei Kombination der sub II und III genannten Methode) unbedingt zu veränderten Produkten führt. Die Einwirkung von Alkali durch Konzentration und Dauer entzieht sich jeder methodischen Kontrolle. Aber ebenso bedarf die Anwendung der ausschließlichen Säurehydrolyse nach *v. Fürth* und *Jerusalem* einiger Rücksicht. Bekanntlich entstehen aus Eiweißkörpern durch Säurehydrolyse schwarze Substanzen, sogenannte „Melanoidsäuren", die je nach ihrer vorhandenen Menge amorph ausfallen oder im Hydrolysengemisch gelöst bleiben. Diese Körper gehen leicht als Säuren mit Alkalien (Ätzalkalien, starkes Ammoniak) in Lösung und verhalten sich dann wie Melaninsäuren selbst, die durch Alkali aus genuinen Pigmenten entstehen. Im Falle der Hippomelanindarstellung hat man diese Substanzen als Verunreinigung wenig zu befürchten, da sie leicht mit Alkali beseitigt werden können (sofern sie überhaupt amorph ausgefallen waren), während das Hippomelanin erst durch mehrstündige Behandlung mit der sechs- bis zehnfachen Menge Ätzkali in Lösung geht. Hingegen ist es wohl denkbar, daß ein genuines Melanin weniger alkaliresistent sein könnte, so daß es mit den Melanoidinsäuren gemeinsam gelöst würde. Man wird in jedem Fall die Säurehydrolyse nur dann anwenden, wenn die vorhandene Eiweißmenge (wie in melanotischen Drüsen) im Vergleich zum Pigmentgehalt eine sehr geringe ist, so daß keine Gefahr vorliegt, daß die geringe Spur entstehender Melanoidine ungelöst ausfiele.

In allen anderen Fällen wird vorläufig eine Alkalibehandlung kaum zu umgehen sein. Nur dürfen in diesen Fällen Analysenresultate, besonders auch für Eisen- und Schwefelgehalt, nicht zu hoch bewertet werden.

Die Darstellung von Melaninen aus Geweben der niederen Tierwelt geschieht im Prinzip nach den eben genannten Methoden. Besondere Berücksichtigung bedarf nur noch die Darstellung und der Nachweis von Melanin und Melanogen aus pathologischem Harn.

Melanin und Melanogen in Harn. Man überzeuge sich zunächst im Falle eines dunkel entleerten oder beim Stehen nachdunkelnden Harnes von der Abwesenheit einer Alkaptonurie (Reduktionsproben, Eisenchloridprobe, Isolierung der Homogentisinsäure). Zur Darstellung des echten Harnmelanins (bei Trägern melanotischer Tumoren beobachtet) fällt man den Farbstoff mit essigsaurem Blei. Der Bleiniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Der Rückstand des Filtrates von dem schwarzbraun gefärbten Bleisulfidniederschlag stellt das Melanin dar.

Einfacher ist eine Fällung des Harnes mit Barytwasser. Der braungelb gefärbten Barytfällung wird der Farbstoff mit Sodalösung entzogen, aus der er mit Mineralsäuren ausgefüllt wird. Wiederholtes Lösen und Fällen aus Lauge mit Säure führt zu reineren, aber keineswegs einheitlichen Produkten.

Bisweilen wird anstatt des Melanins dessen farbloses Chromogen ausgeschieden[1]).

N a c h w e i s. Man bewirkt eine Umsetzung in Melanin durch Zusatz eines oxydierenden Mittels (Eisenchlorid, Kaliumdichromat, Salpetersäure, Brom- oder Chlorwasser + Schwefelsäure unter Vermeidung eines Überschusses). Ein Überschuß des stärker wirksamen Chlor- oder Bromwassers führt zur Bildung eines schmutziggelben Niederschlages.

V. Sonstige Farbstoffe zum Teil unbekannter Natur.

Wir beschließen das Kapitel mit einer kurzen Besprechung der mannigfaltigen „sonstigen" tierischen Farbstoffe, bei denen sogar die Versuche einer Gruppenzuweisung nach chemischen Gesichtspunkten bisher nur willkürlich oder gar nicht gelungen sind. Für ihre Systematik bleibt daher nur die Einteilung nach den ihnen eigenen Grundfarben übrig. Daß hierbei vollständig heterogene Substanzen vereinigt werden, ist zweifelhaft. Bei der Darstellung dieser Körper müssen ganz besonders die im allgemeinen Teil eingangs erwähnten Anweisungen und methodischen Rücksichten beachtet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Eigenschaften dieser Körper findet sich bei *v. Fürth* (s. S. 731, Note 2). Nur für einzelne dieser Substanzen sind genauere methodische Details hier am Platze. Die Mehrzahl dieser Substanzen findet sich bei niederen Tieren.

1. Sogenannte U r a n i d i n e bilden eine Gruppe, die rein willkürlich und durch wenige Klassenmerkmale charakterisiert und abgegrenzt ist (*Krukenberg*[2]):

Gelbe Farbstoffe, die auf Alkalizusatz eine grüne oder blaugrüne Fluorescenz annehmen und sich unter dem Einfluß von Licht oder Sauerstoff leicht zu dunkel gefärbten Produkten umbilden, werden als Uranidine bezeichnet. Die Labilität dieser Körper, auch schon gegen Alkohol, Alkalien oder Wärme ist eine so große, daß eine chemische Charakterisierung bis jetzt nicht möglich ist. Die frischen Lösungen zeigen keine Absorptlonsstreifen.

Methodisches läßt sich über diese Substanzen wenig berichten. Man schließt auf die Existenz dieser Körper, wenn entweder das gefärbte Gewebe oder Extrakte mit neutralem, besser saurem

[1]) Vgl. *Eppinger*: Biochem. Zeitschr. **28**. 181 (1910).

[2]) *R. Krukenberg*: Die Pigmente. Vergleichend-physiologische Studien. I. Reihe. Abt. 3. S. 111. II. Reihe. Abt. 3. S. 41. Abt. 4. S. 172. Abt. 2. S. 53.

Alkohol oder Chloroform, Äther oder Benzol an der Luft oder nach Erwärmen den obengenannten Farbenwechsel durchmachen.

Am stabilsten sind noch Extrakte mit schwach saurem Alkohol (für Holothurien), aus denen Ammoniak das gelblich gefärbte Pigment ausflockt.

Solche Körper fanden sich bei Aplysien, Korallen, Holothurien- und Arenicolaarten.

2. Gelbe Farbstoffe. Bei der Untersuchung solcher Substanzen ist vor allem eine Zugehörigkeit zu Lipochromen auszuschließen, die z. B. für das sogenannte Äthalioflavin aus Aethalium septicum (Protozoon) und das Aplysiofulvin mancher Aplysienarten (Spongien) gelungen ist.

3. Rote Farbstoffe, die bei niederen Tieren weit verbreitet sind, sind zum größeren Teil in Wasser löslich und daher frei von anderen Pigmenten (Lipochromen) darstellbar. Man zerkleinert das fragliche Organsubstrat, bringt Eiweißkörper durch Erhitzen zur Unlöslichkeit, trocknet und extrahiert mit kaltem oder leicht vorgewärmtem Wasser. Nach dieser Art sind mehrere besser charakterisierte Farbstoffe gewonnen, unter anderem die sogenannten Floridine aus Spongien und Korallen (*Krukenberg*[1]).

Für die Floridine ist der Farbenwechsel in Grünblau und die Fällbarkeit durch Ammoniak sowie das Bleichen beim Erwärmen der violett bis grün fluorescierenden Lösungen charakteristisch. Den Floridinen fehlen die für Hämatinderivate typischen Absorptionsstreifen.

Gleichfalls wasserlöslich ist der als Antedonin bezeichnete rote Farbstoff der Haarsterne. Im Gegensatz zu den Floridinen weist eine Lösung des roten Antedonins drei Absorptionsstreifen zwischen *D* und *F* auf. Nach Säurezusatz verändert sich mit einem gleichzeitigen Farbenumschiag in Orange das Spektralbild. Es finden sich nur zwei Bänder um *E* und *F*. Ammoniak fällt aus wässeriger Lösung einen Körper, der trocken ein violettes Pulver darstellt. Eine Analyse der Antedonine liegt nicht vor.

In ammoniakalischem Wasser löslich erwies sich ein Actiniochrom und Purpuridin mancher Actinien, in saurem Alkohol löslich ist ein Pentacrinin zahlreicher Tiefseepentacrinusarten. Die mehr violetten bis blauvioletten Farbstoffe der Echinidienarten hinwieder werden von verdünnter Säure aufgenommen. Das violette Pelagein der Medusa pelagia geht in organische Lösungsmittel (Alkohol, Äther, Eisessig, besonders Schwefelkohlenstoff) über (*Griffiths* und *Platt*[2]). Manche rote Farbstoffe in Tegu-

[1]) *R. Krukenberg*: Ibid. II. Reihe. Abt. 3. S. 36 (1882).

[2]) *A. B. Griffiths* und *Platt*: Sur la composition de la Pélageine. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences. **121**. 451 (1895); Journ. Amer. Chem. Soc. **17**. 877.

menten oder Schalen von Molluskenarten sind erst nach Aufschluß der Gehäuse mit Säuren in Alkohol, Äther oder Chloroform löslich.

Im einzelnen sind für Identifikationen die Absorptionsspektren der Farbstofflösungen zu studieren:

Das Actinochrom [*Mosely*[1]), *Mc Munn*[2])] zeigt ein dem Hämatin ähnliches Spektrum, doch liegt ein Band dem Violett näher.

Purpuridin weist keine Streifen auf. Pentacrinin (*Mosely*[3]) zeigt drei Streifen, und zwar zwischen D und E und zwischen b und F. Durch Ammoniakzusatz erfolgt ein Umschlag in Blaugrün und das Verschwinden der Absorptionsstreifen bis auf ein Band vor B.

Weit verbreitet sind rote Farbstoffe bei Insekten.

Cochenillefarbstoff. Carminsäure aus Coccus cacti wird nach *Schunk* und *Marchlewski*[4]) rein dargestellt.

Die käufliche, aus den flügellosen Weibchen des Insektes bestehende Cochenille wird fein gepulvert und mit kochendem Wasser extrahiert. Die filtrierte Lösung wird mit Bleiacetat gefällt, wodurch der Farbstoff niedergeschlagen wird. Der feuchte Bleisalzniederschlag wird in absolutem Alkohol fein zerteilt und durch tropfenweisen Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure in Lösung gebracht. Die durch Filtration von Bleisulfat getrennte, gelbrote Lösung wird bei niederer Temperatur am schnellsten im Vakuum zur Trockne gedampft. Den Trockenrückstand löst man in kaltem absolutem Alkohol. Aus dieser Lösung wird der tiefrote Farbstoff mit dem mehrfachen Volumen Äther, Benzol oder Chloroform gefällt und auf dem Filter mit dem Fällungsmittel gewaschen. Zur Darstellung von Kristallen überläßt man eine alkoholische oder stark essigsaure Lösung der langsamen Verdunstung im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure.

Der Säure kommt wahrscheinlich die Formel $C_{17}H_{18}O_{10}$ zu, sie dürfte ein Hydrindenderivat sein.

Die alkoholische Lösung zeigt drei unscharf begrenzte Absorptionsstreifen, einer in Grün, zwei in Blau.

---

[1]) *H. N. Mosely*: On Actiniochrom a colouring matter of Actinias which gives an Absorptionsspektrum. Quart. Journ. Micr. Science. **13**. 143 (1873).

[2]) *C. A. Mc Munn*: Observations on the chromatology of Actiniae Proc. Roy. Soc. **38**. 86 (1885); Phil. Trans. **176**. 641 (1885).

[3]) *H. N. Moselye*: On the colouring matters of various animals. Quart. Journ. Micr. Science. **17**. 5 (1877).

[4]) *E. Schunk* und *L. Marchlewski*: Zur Kenntnis der Carminsäure. Chem. Ber. **26**. 2647 (1893); **30**. 1759; unter anderem vgl. hierzu *O. Dimroth*: Zur Kenntnis der Carminsäure. Chem. Ber. **42**. 1611 (1909).

Roter Farbstoff der Kermesschildlaus (Lecanium ilicus). Die Methode der Darstellung sei hier mitgeteilt, da sie möglicherweise generelle Anwendung für andere Farbstoffe finden kann.

Die gepulverten und getrockneten Insekten werden durch Ätherextraktion von Fetten befreit und dann mit schwefelsäurehaltigem Alkohol extrahiert. Zu der alkoholischen Lösung setzt man Äther und so viel Wasser, daß es zu einer Äthertrennung kommt, wobei der Farbstoff in die ätherische Schicht übergeht. Die abgetrennte Ätherlösung wird mit Wasser gewaschen und dann mit einer wässerigen Lösung von Natriumacetat ausgeschüttelt. Die abgetrennte Acetatlösung, die violettrot gefärbt ist, wird mit Schwefelsäure zersetzt, wobei sich aus der nun ziegelroten Lösung nach einiger Zeit ein kristallinischer oder flockiger Farbstoffniederschlag abscheidet. Die Fällung wird gesammelt und aus säurehaltigem Wasser umkristallisiert (*Heise*[1]).

Der Farbstoff ist von Carminsäure leicht unterscheidbar, da er in Äther und Amylalkohol leicht löslich ist. Auch der Farbenumschlag in Violett mit schnell folgendem Abblassen durch Alkali, die schwarze Fällung mit Eisenacetat, die violette mit Bleiacetat und die rotviolette mit Kupfersulfat sind recht charakteristisch.

Rote, purpurrote Farbstoffe finden sich auch bei Warmblütern und Vertebraten.

Sehpurpur der Retina[2]). Die möglichst frischen Netzhäute werden mit einer alkoholfreien wässerigen und schwach alkalisch reagierenden Lösung von gallensaurem Natron extrahiert. Aus dieser Lösung fällt man den Farbstoff mitsamt den Cholaten als harzige Masse mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung. Diese blutfarbstofffreie Masse wird abgetrennt, in Wasser gelöst und durch Dialyse von gallensauren Salzen befreit. Hierbei fällt der Farbstoff flockig aus. Er ist dann in Wasser mit Purpurfarbe wieder löslich, aber gegen Luft, Wärme, saure Alkalien, auch gegen organische Solvenzien sehr empfindlich. Dabei geht eine Entfärbung über Rot, Orange und Gelb vor sich.

4. Blaue Farbstoffe.

Auch diese bis jetzt studierten Farbstoffe sind zumeist wasserlöslich und daher den sie enthaltenden Geweben leicht extrahierbar.

Unter ihnen sind besonders das Cyanein aus dem Schirm blauer Medusen (Rhizostoma u. a.), der Farbstoff in den Flossen von Crenilabrus pavo und das Hämocyanin des Cephalo-

[1]) *R. Heise*: Zur Kenntnis des Kermesbeeren- und Kermesschildlausfarbstoffes. Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. **11**. 513 (1895).

[2]) *W. Kühne*: Zur Darstellung des Sehpurpurs. Zeitschr. f. Biol. **32**. 21 (1895).



podenblutes genauer studiert. Diese Körper erwiesen sich ihrem Verhalten nach als Eiweißkörper sui generis, die aber keinen etwa dem Hämoglobin ähnlichen Aufbau aus einer globinähnlichen Eiweißkomponente und einer organischen metallhaltigen Chromogenkomponente besitzen. Das Hämocyanin ist bereits S. 740 ff. erwähnt.

Darstellungsmethoden. Cyanein. Man verarbeitet die periphere Zone des blauen Medusenschirmes, den man etwa in einer Breite von 5 *mm* abschneidet. Die Gewebsstücke legt man in destilliertes Wasser, wodurch das Gewebe zum Absterben kommt und der freie, vorher körnig abgelagerte Farbstoff in Lösung geht.

Die Lösung ist durch eine Fluorescenz nach dem Rot und durch drei Absorptionsstreifen ausgezeichnet. Einer im Orangegelb zwischen *C* und *D*, einer im Gelbgrün hinter *D* und einer im Grünblau.

Durch Alkalien ist ein farbloses amorphes Pulver fällbar, das sich in Säuren wieder mit roter Farbe löst. Dle wässerige prlmirive Lösung wird durch Säuren gleichfalls rot. Ein Schwermetall (Cu) findet sich nicht in Lösung.

Der blaue Farbstoff von Crenilabrus pavo (*Zeyneck*[1]) findet sich neben anderen roten und gelben Pigmenten im Schuppenkleid dieses Fisches.

Man befreit die blau gefärbten Partien von Schleim durch Abschwemmen mit Wasser und extrahiert dann ergiebig mit Aceton, wodurch ein roter Farbstoff in Lösung geht. Dann läßt man eine Waschung mit trockenem Äther folgen. Nach dieser Vorbehandlung geht der biaue Farbstoff mit destilliertem Wasser in Lösung. Die reinsten Lösungen lassen sich aus den Flossen gewinnen, wenn man die Wasserextraktion nicht allzulange fortsetzt. Eine Darstellung gelingt dann durch Fällung der wässerigen Lösung des Farbstoffes mit 10- bis 15%igem $Am_2 SO_4$, Sammeln und Lösen des Niederschlages, Reinigen durch mehrtägige Dialyse und Einengen der wässerigen Lösung.

Der gewiß noch nicht rein dargestellte Körper scheint ein Eiweißkörper zu sein. Er erwies sich als metallfrei.

Ein blaues Pigment isolierte *Crozier*[2]) aus Chromodoris Zebra Heilprin, einem Nacktkiemer aus Bermuda. Das Pigment ist in Formaldehyd, Alkohol und Aceton löslich, in Äther und $CHCl_3$ unlöslich. Konzentrierte Alkalien bewirken Ausfällung. Säuren verändern. Neutralisation regeneriert die Farbe. Die maximale

[1]) *R. v. Zeyneck*: Über den blauen Farbstoff aus den Flossen von Crenilabrus Pavo. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34.** 148 (1901); ibid. **36.** 568 (1902).

[2]) *W. J. Crozier*: Journ. of Physiol. **47.** 491 (1914).

Absorption in neutraler Lösung liegt bei λ 621, in saurer bei λ 629, in alkalischer bei λ 620.

Über Cyanokristallin s. S. 774.

5. Grüne Farbstoffe.

Auch hier gilt das im allgemeinen Teile besprochene Prinzip, zu einer Darstellung oder einer Isolierung das geeignete Lösungsmittel zu wählen.

So kann das Bonellein aus Bonellia viridis (Klasse der Würmer) mit Alkohol oder Äther entzogen werden. Wasserzusatz fällt aus salzsaurem Alkohol einen grünen Flockenniederschlag [*Gottlieb Schunck*[1]), *Sorby*[2])]. Der Körper zeigt ein charakteristisches spektroskopisches Verhalten. Vier Bänder (zwischen C und D, bei D, zwischen E und b und zwischen E und F), deren Lage aber von jenen einer Chlorophyllösung verschieden ist. Auch das stabile Verhalten in alkoholischer Lösung gegen Säuren (Purpurfärbung) und Alkalien (Rückbildung des ursprünglich grünen Farbstoffes) unterscheidet von Chlorophyll.

Gleichfalls in Alkohol löslich ist der grüne Farbstoff Chätopterin (*Ray-Lancester*[3]) aus Chaetopterus. Er zeigt vier anders gelegene Absorptionsstreifen und wird auf Säure indigoblau, nach Alkalizusatz citronengelb. Ein grünes Pigment aus Phyllodoce viridis zeigt in Alkohol keine Absorptionsstreifen und wird durch Säure braungelb, durch Ammoniak schön rot.

Andere grüne Farbstoffe sind in verdünnten Säuren löslich und durch Alkalizusatz unter Purpurfärbung fällbar (aus Aedosoma tenebrarium, Klasse der Oligochäten).

Auf die Frage nach der Darstellung und den Nachweis von tierischem Chlorophyll kann hier nicht eingegangen werden. Es sei nur hervorgehoben, daß die Identifikation als echtes Chlorophyll nur durch die exakteste spektroskopische Beobachtung und Analyse gestattet ist (*Engelmann*) oder die direkte Bestimmung einer Sauerstoffausscheidung und eines Kohlensäureverbrauches und daß daneben der sichere zoologische Nachweis erbracht werden muß, daß der fragliche Körper nicht ein von außen eingeführtes und etwa umgeformtes Chlorophyll, sondern ein selbstgebildetes Chlorophyll darstellt. (Vgl. hierzu die Derivate des Chlorophylls und Hämoglobins und die chemischen Beziehungen beider.)

---

[1]) *Schunk*: Der grüne Farbstoff von Bonellia viridis. Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wissensch., Math.-naturw. Kl. **72**. II. 581 (1875).

[2]) *Sorby*: On the colouring matter of Bonellia viridis. Quart. Journ. Micr. Science. **15**. 166. (1875).

[3]) *Ray-Lancester*: On the green Pigment of the intestinal wall of the Annelid Chaetopterus. Quart. Journ. Micr. Science. **40**. 447 (1898).

SACHREGISTER.

(Die Ziffern bedeuten die Seitenzahlen.)

C

D

R

S

Lfg. 30 (Abt. I, Teil 1): **Hirsch,** Prüfung der Lösungen und Reagentien. — **Eichwald,** Optisch-aktive Kohlenstoffverbindungen. — **Schmidt,** Tautomerie und Desmotropie . . M 81.—

Lfg. 31 (Abt. I, Teil 3): **Lockemann,** Aschenanalyse . . . . M 45.—

Lfg. 32 (Abt. IV, Teil 7): **Autenrieth,** Nachweis u. Bestimmung der Gifte auf chemischem Wege M 105.—

Lfg. 33 (Abt. V, Teil 3): **Rhumbler,** Nachahmung von Lebensvorgängen durch physikalische Konstellationen . . . . M 54.—

Lfg. 34 (Abt. IX, Teil 1): **Przibram,** Methoden der Experimentalzoologie . . . . . . M 24.—

Lfg. 35 (Abt. X): **Abel,** Methoden der paläobiologischen Forschung . . . . M 48.—

Lfg. 36 (Abt. XI, Teil 1): **Körnicke,** Mikroskopische Technik . . . . M 18.—

Lfg. 37 (Abt. I, Teil 1): **Bauer,** Nachweis ungesättigter Verbindungen . . . . M 21.—

Lfg. 38 (Abt. I, Teil 3, Schlußheft): **Arndt,** Die wichtigsten elektrochemischen Methoden. — **Hamburger,** Quantitative Bestimmung von Niederschlägen auf mikrovolumetrischem Wege. — **Lieb,** Mikroelektrolytische Bestimmung des Kupfers. — **Scheel,** Das Arbeiten mit der Makrowage. — **Abderhalden,** Das Arbeiten mit der Gewichtszu- und -abnahmen automatisch registrierenden Wage. — **Embden,** Eine gravimetrische Bestimmungsmethode für kleine Phosphorsäuremengen. — Nachtrag zu **Herzig,** Über Methoxyl- und Methylimidbestimmung. — Inhaltsübersicht und Register zu Teil 3 . . . . M 24.—

Lfg. 39 (Abt. I, Teil 8): **Schumm,** Nachweis und Bestimmung von Porphyrin. Bildung und Merkmale des Hämatins. — **Osborne-Strauss,** Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt. — **Schulz,** Darstellung von kristallisiertem Eiweiß. — **Samuely-Strauss,** Eigentliche Proteine. — **Strauss,** Proteinoide . . . . M 54.—

Lfg. 40 (Abt. II, Teil 1): **Geitel,** Photoelektrische Meßmethoden. — **Schmehlik,** Stereoskopische Arbeitsmethoden. — Projektionsmethoden. — **Kauffmann,** Fluoreszenzerscheinungen M 42.—

Lfg. 41 (Abt. V, Teil 6): v. **Hess,** Methoden zur Untersuchung des Licht- und Farbensinnes sowie des Pupillenspieles . . . . M 51.—

Lfg. 42 (Abt. I, Teil 10): **Freudenberg,** Gerbstoffe. — **Sieburg,** Saponine . . . . . M 39.—

Lfg. 43 (Abt. IV, Teil 3): **Untersuchungen des Blutes und der Lymphe: Lampe,** Technik der Blutentnahme. — **Müller,** Blutkörperchenzählung und Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes. — Bestimmung des spezifischen Gewichtes. — Bestimmung der Blutmenge. — **Schumm,** Spektrographische Methoden. — **Heubner,** Anwendung photographischer Methoden. — **Morawitz,** Blutgerinnung . . . . M 72.—

Lfg. 44 (Abt. V, Teil 4): **Klemensiewicz,** Verfahren und Einrichtungen zur Beobachtung des Blutstromes an Kaltblütern. — **Weiss,** Mikroskopische Beobachtung und mikrophotographische Darstellung der Kapillaren. — **Müller,** Umlaufszeit des Blutes . . M 36.—

Lfg. 45 (Abt. V, Teil 7): **Budde,** Mathematisches zur Phonetik . . . . M 18.—

Lfg. 46 (Abt. VI, Teil C): **Danzel,** Entwicklungspsychologie . . . . M 18.—

Lfg. 47 (Abt. VIII): **Herxheimer,** Histologische Technik . . . . M 90.—

Lfg. 48 (Abt. X): **Eckardt,** Paläoklimatologie . . . . M 21.—

Lfg. 49 (Abt. VI, Teil D): **Vergleichende Tierpsychologie: Szymanski,** Vergleichende Psychologie. — **Köhler,** Psychologische Forschungen an Affen . . . . . . M 33.—

Lfg. 50 (Abt. XI, Teil 2): **Ruhland,** Vitalfärbung bei Pflanzen. — **Mitscherlich,** Versuche in Vegetationsgefäßen und auf Versuchsfeldern. — **Heinricher,** Aufzucht und Kultur der parasitischen Samenpflanzen. — **Karsten,** Gewächshauskulturen. — Phytoplankton. — **Pringsheim,** Algenkultur. — Pilzkultur . . . . M 69.—

Lfg. 51 (Abt. XI, Teil 1): **Diels,** Phytographie und Systematik der Pflanzen . . . . . M 33.—

Ferner erschienen soeben:

Lfg. 52 (Abt. I, Teil 5): **Zemplén,** Kohlenhydrate (S. 1—400) . . . . M 120.—

Lfg. 53 (Abt. I, Teil 6): **Fraenkel,** Lipoide. — **Winterstein,** Phosphatide aus Pflanzen. — **Thierfelder,** Cerebroside. — **Windaus,** Abbau und Aufbau der Sterine. — **Hammarsten,** Darstellung der Gallensäuren. — **Borsche,** Abbau und Aufbau der Gallensäure. M 84.—

Lfg. 54 (Abt. I, Teil 7): **Abderhalden,** Monoaminosäuren. — **Weil,** Nachweis der Monoaminosäuren. — **van Slyke,** Analyse von Eiweißkörpern. — **Winterstein,** Isolierung von Aminosäuren. — **Fodor,** Nachweis, Bestimmung und Synthese der Monoaminosäuren. — **Ehrlich,** Spaltung von Aminosäuren. — **Steudel,** Histidin, Lysin und Arginin. — Hexonbasen. — **Zimmermann,** Karbaminosäuren. — **Jessen-Hansen,** Formoltitration . . . . M 78.—

Lfg. 55 (Abt. V, Teil 6): **Vogt,** Untersuchungen des Auges im rotfreien Licht. — **Basler,** Prüfung der übrigen Funktionen der Netzhaut. — **Struycken,** Nystagmus. . . . . . M 36.—

Lfg. 56 (Abt. VI, Teil B): **Behn,** Psychologische Methoden der Traumforschung. — **Lindworski,** Methoden der Phantasie. — Methoden der Denkforschung . . . . M 24.—

Lfg. 57 (Abt. VII): **Wetzel,** Peri- und diagraphische Meßapparate zur Feststellung von Umrißformen. — **Knopfli,** Tiergeographie. — **Keller,** Haustierforschung. — **Sussdorf-Ackerknecht,** Präparatorisch-anatomische Methoden bei höheren Säugetieren. M 36.—

Lfg. 58 (Abt. XI, Teil 1): **Linsbauer,** Tropismen und Nastieen. — **Karsten,** Pflanzengeographie und Pflanzenmorphologie. — **Schröter,** Erforschung in Nationalparken . . . M 60.—

Lfg. 59 (Abt. XI, Teil 2): **Grafe,** Samenkeimung. — **Vouk,** Wachstum der Pflanzen. — **Weber,** Frühtreiben der Pflanzen. — **Grafe,** Sterilisieren. — **Pringsheim,** Sand- und Wasserkultur höherer Pflanzen . . . . M 60.—

Lfg. 60 (Abt. I, Teil 8, Schlußheft): **Steudel,** Histone und Protamine. — **Pohl,** Das Arbeiten mit Organeiweiß. — **Jessen-Hansen,** Darstellung und Untersuchung eines wohldefinierten Eiweißstoffes. — **Strauss,** Umwandlungsprodukte der Proteine. — **Rona** und **Strauss,** Methoden zur Enteiweißung von eiweißhaltigen Flüssigkeiten. — **Samuely †** und **Strauss,** Tierische Pigmente und Farbstoffe. — Titel, Inhalt, Sachregister zu Abt I, Teil 8. M 75.—

Preiserhöhungen vorbehalten. — Jede Lieferung ist auch einzeln käuflich.